

УДК 636.09:616–089.843:

602.9

© 2017

ПЕРСПЕКТИВИ РОЗВИТКУ КЛІТИННИХ ТЕХНОЛОГІЙ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ

А.Й. Мазуркевич,
член-кореспондент НААН,
доктор
ветеринарних наук

М.О. Малюк,
доктор
ветеринарних наук

В.Б. Данілов,

В.В. Ковпак,

Ю.О. Харкевич,
кандидати
ветеринарних наук

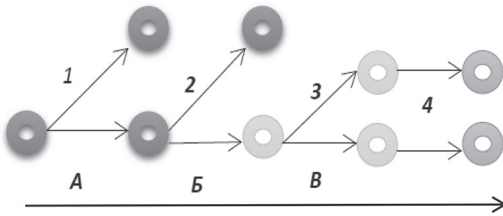
Національний
університет біоресурсів
і природокористування
України

Мета. Запровадити науково обґрунтовану систему використання стовбурових клітин у ветеринарній клітинній регенеративній медицині з урахуванням світового досвіду та досягнень вітчизняної біології і ветеринарної медицини. **Методи.** Аналітичні, експериментальні, лабораторні, клінічні, порівняльні, статистичні. **Результати.** Запропоновано основні напрями широкого впровадження методів клітинної терапії у клінічну ветеринарну медицину. **Висновки.** З метою прискорення темпів розвитку вітчизняної ветеринарної клітинної регенеративної медицини потрібно зосередити зусилля наукової, освітянської та практичної сфери галузі на впровадження методів клітинної регенеративної медицини у клінічну практику через поглиблення наукових досліджень і поширення знань серед фахівців ветеринарної медицини. Для забезпечення потреб ветеринарних клінік в якісних і безпечних продуктах клітинних технологій потрібно розробити пакет нормативних документів (регламентів, інструкцій, положень та ін.). Запропонована система використання донорських стовбурових клітин у ветеринарній медицині дає змогу значно здешевити метод регенеративної медицини і зробити його доступним для широкого кола користувачів.

Ключові слова: ветеринарна медицина, трансплантація, стовбурові клітини, розвиток клітинних технологій.

Використання стовбурових клітин (СК) у клінічній практиці ветеринарної медицини стало можливим завдяки феноменальним відкриттям у біології та біотехнології. Вони ґрунтуються на здатності СК після їх уведення в організм тварини-реципієнта відновлювати порушену клітинну структуру того чи іншого органа [1–3].

Безліч публікацій в останні 20 років щодо результатів вивчення властивостей стовбурових клітин *in vitro* та *in vivo*, результатів експериментальних і клінічних випробувань свідчать про високу актуальність та перспективність проблеми використання стовбурових клітин в біології, гуманній та ветеринарній медицині [4–6].



Диференціація клітин: А — зі стовбурових, Б — у прогеніторні та В — у зрілі диференційовані клітини; поділ (мітоз) клітин: 1 — симетричний; 2 — асиметричний; 3 — прогеніторний; 4 — кінцевий (поділ клітин, які виходять у G0-фазу клітинного циклу)

Як відомо, СК — це недиференційовані (незрілі) клітини, наявні в усіх багатоклітинних організмах. У СК відсутня спеціалізація, яка притаманна спеціалізованим клітинам. Вони самі себе відновлюють завдяки симетричному й асиметричному поділу [7].

Внаслідок симетричного поділу виникають обидві дочірні клітини стовбурові, в той час, коли асиметричний поділ дає одну дочірню клітину стовбурову, а іншу — клітину-попередницю для інших типів клітин. Клітина-попередниця проходить кілька етапів поділу клітин і згодом остаточно диференціюється у зрілу клітину. Клітини, утворені внаслідок симетричного та асиметричного поділів, відрізняються між собою на молекулярному рівні, очевидно, завдяки наявним у них білковим рецепторам на цитоплазматичній мембрані.

Саме в такий спосіб в організмі тварини поновлюється клітинний склад органа чи тканини та забезпечується клітинний гомеостаз цілісного організму впродовж усього його індивідуального життя.

Ученими встановлено, що кількісний склад СК в організмі змінюється з віком. На найраніших стадіях розвитку організму зародок (запліднений ооцит і бластомери 2–8-клітинної стадії) повністю складається із СК. Ці клітини за здатністю до диференціювання зараховують до тотипотентних, оскільки вони можуть формувати всі ембріональні та екстра-ембріональні типи клітин. Останні здатні формувати всі типи клітин ембріона і належать до плюрипотентних СК. У новонародженому організмі кількість СК зменшується вже до 1 СК

на 10 тис. спеціалізованих клітин, а в зрілому віці це співвідношення становить — 1 СК на 300 тис. спеціалізованих клітин.

Основним місцем утворення СК у дорослому організмі є кістковий мозок. Крім того, практично у всіх видах тканин виділені так звані тканинспецифічні СК.

У процесі старіння організму запаси СК поступово виснажуються з різною швидкістю залежно від індивідуальних особливостей організму, характеру пережитих ним патологічних процесів і впливу довкілля. Відповідно знижуються й можливості до самовідновлення його тканин.

Характерна «поведінка» СК за наявності в організмі патологічного процесу, внаслідок якого інтенсивно руйнуються структури організму. СК, які циркулюють у крові разом із тканинспецифічними СК, завдяки активному розмноженню поступово відновлюють порушену структуру тканини. Крім того, останнім часом встановлено, що тканинспецифічні СК здатні диференціюватись у клітини інших тканин завдяки своїй пластичності (явище трансдиференціації). Отже, процес регенерації тканини відбувається завдяки активності не тільки регіональних СК, а й завдяки використанню саме циркулюючих у крові й лімфі СК інших ліній, здатних самостійно знаходити ушкоджені місця в тканинах і відновлювати їх завдяки своїй здатності до трансдиференціації [8].

Великий біологічний сенс такої «поведінки» СК в організмі, спрямованої на забезпечення структурної цілісності та клітинного гомеостазу організму за фізіологічних умов та умов порушень цілісності тканин чи органів, очевидний.

Незважаючи на бурхливий розвиток досліджень у сфері вивчення СК, ще далеко не всі сторони їх біологічних властивостей вивчено. За висновками експертів, у найближчі десятиріччя значно розшириться ареал використання СК у ветеринарній клінічній практиці. Вже зараз наука має змогу запропонувати виробництву новітні методи лікування високоцінних тварин: племінних, комунікативних і високопродуктивних.

Зростання попиту на використання СК і продуктів клітинних технологій у ветеринарній клітинній регенеративній медицині

поступово зростає та спрямоване на пошук нових можливостей для продовження життя та термінів використання племінних і продуктивних тварин, яких із різних причин (ураження печінки, молочної залози, яєчників, нирок, органів і тканин опорно-рухового апарату та ін.) вибраковують через неефективність лікування їх традиційними методами. Ці проблеми стосуються насамперед скотарства, конярства, вівчарства, свинарства, а також сфери використання спортивних і комунікативних тварин, збереження генофонду.

Попри всі заборони, неузгодженості в суспільстві щодо вирішення дилеми: використовувати чи не використовувати СК для лікування, — клітинна регенеративна медицина стрімко розвивається, пропонуючи клініцистам сучасні високоєфективні, екологічно безпечні методи лікування, якими будь-коли користувалося людство, і які мають своє майбутнє.

Дослідження вітчизняних учених у цій сфері істотно відстають від зарубіжних попри те, що саме українські вчені одні із перших застосували СК для ефективного лікування хворих, зокрема і зарубіжних пацієнтів. У 1992 р. професор О. Смикодуб з колегами у щойно створеній приватній клініці «ЕмСелл» успішно лікував хворих на розсіяний склероз, діабет, хворобу Альцгеймера та ін., використовуючи для цього абортівні ембріони. За рубежем спроби використання СК з лікувальною метою тоді тільки розпочинались.

Досягнення сучасної ветеринарної науки і практики. Нині, незважаючи на серйозні етичні та юридичні неузгодженості, в наукових лабораторіях і клініках різних країн світу розвиток технологій, методи лікування хворих з використанням СК набирають високих темпів. У літературі наведено приклади успішного лікування СК найскладніших хвороб, які не піддаються лікуванню наявними традиційними методами.

У ветеринарній медицині застосування СК для лікування тварин зародилося практично одночасно з дослідженнями їх властивостей в біології та гуманній медицині, оскільки всі досліді в медичних лабораторіях проводять саме на тваринах. Проте

результати таких досліджень не можуть бути використані у ветеринарній медицині, оскільки видові властивості СК тваринного походження вимагають від дослідників враховувати це в методах отримання СК, їх виділення, культивування, зберігання та способах застосування. Крім того, не вивченими до кінця залишаються питання видової чутливості та характеру імунної відповіді з боку організму тварин-реципієнтів на донорські клітини. Не встановлені способи і кратність введення клітин та їх доза. Попри високу актуальність проблеми наукові дослідження до цього часу ще в зародковому стані.

Уперше в Україні дослідження із вивчення властивостей СК тваринного походження та можливостей використання клітинних технологій у ветеринарній клітинній регенеративній терапії на державному рівні розпочались у 2006 р. у проблемній науковій лабораторії фізіології та експериментальної патології тварин НУБіП України. За порівняно короткий проміжок часу розроблено середовища для ефективного культивування СК різних видів тварин, встановлено технологічні параметри процесів отримання СК з найвищою біологічною активністю. Уперше отримано ембріональні СК із 5-добового зародка на стадії бластоцисти після штучного запліднення яйцеклітини свині *in vitro* за оригінальною схемою та проведено спрямоване диференціювання СК у кардіоміоцити.

За результатами цих досліджень розроблено нові або модифіковано наявні методи відбору клітинного матеріалу від тварин різних видів, виділення із нього мезенхімальних СК з використанням відповідних технологічних регламентів, які забезпечують їм найвищу біологічну активність [9]; встановлено високу регенеративну здатність трансплантованих мезенхімальних СК у відновленні експериментально ушкодженої шкіри, суглобового хряща, сухожилків, нирок, печінки, підшлункової залози; встановлено особливості імунної відповіді з боку організму тварин-реципієнтів на введені аlogenні та ксеногенні мезенхімальні СК (МСК) [10, 11], виявлено характеристики специфічних маркерів МСК як показників для оцінки їх біологічної активності та

видової належності [12]; досліджено вплив МСК на особливості патогенезу пухлинного процесу в організмі мишей-реципієнтів так званих «високоракових» ліній [13].

В організмі тварин-реципієнтів не виникає імунної відповіді на введені алогенні МСК такого характеру (як це спостерігається після трансплантації органів і тканин), оскільки МСК виділяють біологічно активні речовини — імуносупресори, які знижують чутливість до них з боку клітин імунної системи [9, 14]. Тому після трансплантації не відбувається їх відторгнення, нема потреби у виборі індивідуального підходу у використанні СК для лікування тварин. На введені ксеногенні МСК у тварин-реципієнтів виникають імунні реакції, сила яких, залежно від виду тварин, призводить до зниження регенеративної здатності введених МСК на 35–45%.

Результати досліджень захищені 19 патентами, увійшли до науково обґрунтованих методичних рекомендацій, а також монографій, підручників, навчальних посібників [15], наукових статей, доповідалися на наукових форумах, висвітлювалися по телебаченню та в інших засобах масової інформації. За результатами досліджень підготовлено і захищено 6 кандидатських та одна докторська дисертації, більше 10 дипломних робіт магістрів-науковців. У виконанні завдань наукової тематики беруть участь докторанти, аспіранти та магістри за науковою спеціалізацією з напрямку «Клітинні технології у ветеринарній медицині».

Отримані результати експериментальних досліджень проходять клінічну апробацію для подальшого використання у ветеринарній клітинній регенеративній терапії. Запропоновано нові підходи до використання алогенних СК, що дає змогу використовувати їх від однієї тварини-донора для лікування цілої групи інших тварин цього самого виду. Перевагою такого підходу є можливість використовувати клітини від здорових донорів для лікування багатьох тварин одного виду, в той час як використання аутогенної клітинної терапії передбачає лікування хворої тварини тільки її власними СК, що значно скорочує можливість використання СК та в рази підвищує вартість такого лікування. За ефективністю

і безпечністю метод використання алогенних СК не поступається перед застосуванням аутогенних СК, що на порядок знижує вартість лікування, робить його доступним для широкого використання.

Перспективи розвитку. Об'єктом для застосування СК мають стати не тільки дрібні домашні та комунікативні тварини, яких утримують індивідуально в домашніх умовах, а й високоцінні (продуктивні, спортивні, екзотичні та ін.). Проведення випробувань потребує постійного контролю за станом здоров'я пацієнтів упродовж усього періоду контролю.

З метою прискорення темпів упровадження методів клітинної терапії у ветеринарну клінічну практику в НУБіП України в 2016 р. створено навчально-наукову лабораторію «Центр клітинних технологій у ветеринарній медицині». Це перший в Україні і поки що єдиний центр у галузі ветеринарної медицини (у медичній галузі таких центрів уже 12). Місія Центру полягає у подальшому поглибленні досліджень, поліпшенні якості підготовки наукових кадрів вищої кваліфікації та висококваліфікованих фахівців ветеринарної медицини з питань застосування сучасних методів клітинної регенеративної терапії тварин, а також поширенні досвіду в установах ветеринарної медицини.

У проекті концепції розвитку клітинних технологій у ветеринарній медицині передбачено комплекс організаційних заходів щодо поглибленого дослідження властивостей СК та інших продуктів клітинних технологій, поширення досвіду клінічного їх використання, організації системи впровадження методів ветеринарної клітинної регенеративної терапії.

У науковій сфері. Потребують подальшого поглибленого вивчення особливості застосування СК для відновлення структури і, відповідно, функції молочної залози, міокарду, тканин опорно-рухового апарату, тканин системи розмноження, ока, інших органів; для лікування тварин з онкологічними процесами та ін.

Одним із не вирішених до кінця питань як у гуманній, так і ветеринарній медицині є відсутність результатів вивчення властивостей власних СК.

Сучасні наукові та практичні дії зосереджені винятково на використанні донорських СК з лікувальною (відновлювальною) метою в організмі тварини-реципієнта у тих випадках, коли встановлено очевидні незворотні зміни, які часто вже не піддаються лікуванню традиційними методами, коли власні СК неспроможні забезпечити потребу організму у відновленні структури ушкоджених тканин або самі призводять до їх патологічних змін.

Проте в літературі практично немає інформації про засоби та способи посилення потенції власних СК в організмі тварини за фізіологічних умов і в умовах хвороби. Безперечно, що результати таких досліджень дають змогу по-іншому поглянути на роль замісної клітинної регенеративної медицини, отримати відповідь на питання про доцільність застосування трансплантації донорських клітин. Де та межа, за якою організм не може перемогти патологію самостійно? Коли потрібно застосувати трансплантацію клітин, а коли — методи стимуляції активності власних СК? Які методи стимуляції їх активності у хворому організмі можна використати? На ці та інші запитання можна знайти відповідь після майбутніх досліджень.

Ще одним важливим і перспективним напрямом розвитку клітинних технологій у ветеринарній медицині має стати розвиток клітинної інженерії, і зокрема, в питаннях отримання клітинного і тканинного матеріалу тваринного походження як альтернативного джерела для використання його у медичній трансплантології для лікування людини. Можливість використання органів (печінки, нирок) тварин для трансплантації хворим людям у медичній трансплантології доведено вже давно.

Як відомо, великою проблемою в медичній трансплантології є постійний дефіцит трансплантатів. За оцінкою експертів, річна потреба галузі в середньому становить 35–40 тис. донорських органів, а через масове каліцтво людей у зоні АТО останнім часом ця потреба значно зросла. У багатьох лабораторіях світу доведено можливість використання як альтернативного джерела трансплантатів штучних органів, які отримують формуванням матриці за

спеціальною комп'ютерною програмою та наповненням цієї матриці відповідними лініями СК. Інший напрям, який нині інтенсивно досліджують, — використання органів від тварин-донорів, зокрема від свиней, з генотипом людини.

Метод трансплантації людям органів тваринного походження має свою давню історію. Проте, оскільки в організмі реципієнта існує імунна реакція проти ксенотрансплантата, зазвичай це завершується відторгненням останнього, лікарі змушені тривалий час застосовувати реципієнту імунодепресанти, щоб уникнути відторгнення. Обнадійливі результати отримані вченими США, Австралії, Іспанії, Великої Британії, Китаю, інших країн. Завдяки останнім досягненням клітинної інженерії вони отримали тваринні трансплантати, які не викликають подібної реакції відторгнення. Ці трансплантати отримано від поросят з генотипом людини. Отже, на порозі майбутнього трансплантології — результат наукового пошуку, колосальне досягнення. Органи, отримані від таких тварин, мають набагато нижчу антигенність, не викликають проти себе імунних реакцій з боку організму реципієнта, а можливості отримання таких донорських матеріалів тваринного походження практично необмежені.

На відміну від тканинних трансплантатів СК не тільки мають найнижчу імуногенність, а й наділені імуносупресивною активністю. Доведено, що у тварин-реципієнтів практично немає імунної відповіді на введення алогенних СК (від тварини одного виду), як і за введення аутогенних (власних) СК, і тому вони не здатні викликати імунних реакцій з боку організму у тварин-реципієнтів.

Розв'язання проблем використання СК та окремих органів і тканин тваринного походження у відновній терапії людини — це веління часу. Воно вкрай необхідне і має бути реалізоване спільними зусиллями дослідників від ветеринарії, біології та медицини і суміжних наук.

У практичній сфері. Як відомо, для формування суспільної думки щодо доцільності використання нововведень з будь-якого питання потрібний певний час. Для прикладу можна навести історію впровадження

методу трансплантації кісткового мозку людям для лікування променевої хвороби. Після першої публікації про успішне лікування у людини за допомогою цього методу пройшло 6 років до початку широкого використання цього методу.

Поширення методів клітинної регенеративної терапії у ветеринарній медицині також потребує певної витримки і часу, а також активної діяльності. *По-перше*, потрібна належна професійна поінформованість фахівців і власників тварин щодо ефективності і доцільності застосування СК і продуктів клітинних технологій у ветеринарній медицині, вартості послуг та ін. Без глибоких знань видової біології СК неможливо розробити наукові рекомендації щодо отримання, культивування, зберігання клітинного матеріалу для отримання активних популяцій СК; без вивчення глибоких механізмів взаємодії між введеними СК та організмом рециєнта неможливо, а часом і небезпечно, призначати лікування СК та прогнозувати рівень ефективності від їх застосування. Це потребує розширення системи підготовки фахівців з глибокими знаннями та уміннями у сфері клітинних технологій та клінічного використання СК через магістратуру і підвищення кваліфікації лікарів ветеринарної медицини. Усі необхідні умови для цього є в НУБіП України.

По-друге, для прискорення процесів упровадження потрібно створити мережу ветеринарних установ і клінік, оснащених сучасним обладнанням та із штатом кваліфікованих фахівців з правом використовувати СК у своїй діяльності. Вирішення

цього питання стане реальним у міру поширення знань і досвіду, перебудови свідомості у споживачів — цих самих кваліфікованих фахівців і власників тварин.

По-третє, упровадження методів клітинних технологій та клітинної регенеративної медицини неможливе без напрацювання відповідної, адаптованої до міжнародних вимог, вітчизняної нормативно-правової бази. А така база потрібна для супроводу необхідних процедур і регламентів у питаннях здійснення моніторингу та контролю якості і безпечності СК і продуктів клітинних технологій у ветеринарній медицині; для захисту тварин-рециєнтів, тварин-донорів; для встановлення правил, за якими мають працювати фахівці у сфері отримання, зберігання і транспортування клітинних матеріалів та застосування їх у регенеративній терапії.

Майбутнє ветеринарної терапії не за хімічними препаратами, а за засобами природного походження. Подальший розвиток біотехнологій та інструментального озброєння науки і клінічної практики, вдосконалення методів досліджень дадуть змогу вченим у недалекому майбутньому знайти і впровадити у практику найбезпечніші в екологічному відношенні та найефективніші і безпечні для організму лікувальні засоби біофармакології, і зокрема продуктів клітинних технологій, для відновлення втраченої структури і, відповідно, функції організму. Сама собою зникне потреба використання наявних синтетичних фармакологічних засобів і певною мірою розв'яже екологічні, токсикологічні, генетичні та інші проблеми.

Висновки

З метою прискорення темпів розвитку вітчизняної ветеринарної клітинної регенеративної медицини потрібно зосередити зусилля наукової, освітянської та практичної сфери галузі на впровадження методів клітинної регенеративної медицини у клінічну практику через поглиблення наукових досліджень і поширення знань серед фахівців ветеринарної медицини. Для забезпечення потреб ветеринарних

клінік в якісних і безпечних продуктах клітинних технологій пропонуємо розробити пакет нормативних документів (регламентів, інструкцій положень та ін.). Запропонована система використання донорських стовбурових клітин у ветеринарній медицині дає змогу значно здешевити метод регенеративної медицини і зробити його доступним для широкого кола користувачів.

Бібліографія

1. Miki T. Amnion-derived pluripotent/multipotent stem cells/T. Miki, S.C. Strom//Stem Cell Rev. — 2006. — V. 2. — P. 133–142.
2. Fortier L.A. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications/L.A. Fortier//Vet Surg. — 2005. — № 34(5). — P. 415–423.
3. Hillebrands J.L. Origin of vascular smooth muscle cells and the role of circulating stem cells in transplant arteriosclerosis/J.L. Hillebrands, F.A.Klatzer, J. Rozing//Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. — 2003. — V. 23. — № 3. — P. 380–387.
4. Сарфати Д. Стволовые клетки и Книга Бытия/Д. Сарфати//Т. — 2001. — № 15(3). — P. 19–26.
5. Бутенко Г.М. Ствобурові клітини і проблема відновлення периферичних нервів/Г.М. Бутенко, Ю.Б. Чайковський//Здорове довголіття. — 2013. — № 5 (101). — С. 56–59.
6. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей/Н.И. Калинина, В.Ю. Сысоева, К.А. Рубина и др.//Acta naturae. — 2011. — Т. 3. — № 4 (11). — С. 22–39.
7. The new stem cells biology: something for everyone/S.L. Preston, M.R. Alison, S.J. Forbes et al.//Mol. Patol. — 2003. — V. 56. — P. 86–96.
8. Петренко А.Ю. Стволовые кроветворные клетки из разных источников/А.Ю. Петренко, В.И. Грищенко//Международ. мед. журн. — 2003. — Т. 1. — С. 123–129.
9. Використання мезенхімальних ствобурових клітин тваринного походження для корекції репаративних процесів в організмі тварин-реципієнтів: метод. реком./А.Й. Мазуркевич, В.Б. Данілов, М.О. Малюк та ін. — К., 2012. — 42 с.
10. Ствобурові клітини у ветеринарній медицині. Т. I. — Експериментальні дослідження з отримання, зберігання і застосування мезенхімальних ствобурових клітин/А.Й. Мазуркевич, М.О. Малюк, В.В. Ковпак та ін. — К.: ТОВ ЦП «Компринт», 2013. — 266 с.
11. Мазуркевич А.Й. Морфологічні зміни у підшлунковій залозі за алоксанового цукрового діабету у щурів/А.Й. Мазуркевич, В.В. Ковпак, Ю.О. Харкевич//Наук. вісн. НУБіП України. — Серія «Ветер. медицина, якість і безпека продукції тваринництва». — 2015. — № 227. — С. 155–159.
12. Immunophenotypic characterisation and cytogenetic analysis of mesenchymal stem cells from equine bone marrow and foal umbilical cords during in vitro culture/A. Mazurkevych, M. Malyuk, N. Bezdniezhnykh et al.//J. of Veter. Research/ form. Bull. of the Vet. Institute in Pulawy. — V. 60, Iss. 3 (Sep 2016). — P. 339–347.
13. Життєздатність та проліферативна активність мезенхімальних ствобурових клітин лінійних мишей С 57BL/6 залежно від умов виділення первинного матеріалу/Л.В. Кладницька, В.В. Ковпак//Наук. вісн. НУБіП України. — Серія «Ветеринарна медицина». — К., 2013. — Вип. № 188, Ч. 3. — С. 578–585.
14. Pittenger M.F. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells/M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck et al.//Science. — 1999. — V. 284. — P. 143–147.
15. Клітинні технології у ветеринарній медицині: навч. посіб./А.Й. Мазуркевич, В.В. Ковпак, В.Б. Данілов та ін. — К., 2014. — 131 с.

Надійшла 3.03.2017.