



ЛУКАШ

Любов Леонідівна – доктор біологічних наук, завідувач відділу генетики людини Інституту молекулярної біології і генетики НАН України

КЛІТИННІ БІОТЕХНОЛОГІЇ З РОЗРОБЛЕННЯ НОВИХ ЕКВІВАЛЕНТІВ ДЕРМИ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ МАСИВНИХ ОПІКІВ

**Стенограма доповіді на засіданні
Президії НАН України 5 жовтня 2022 року**

Доповідь присвячено результатам багаторічних досліджень, проведених в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України, зі створення нових ефективних та безпечних тимчасових еквівалентів дерми, або дермальних покриттів, для лікування масивних опікових ран.

Шановний Анатолію Глібовичу!

Шановні присутні! Колеги!

Опікова хвороба – це складний комплекс загальних реакцій організму та клінічних симптомів, які охоплюють пошкодження шкіри і прилеглих тканин, розлади біохімічних, імунних, обмінних та багатьох інших функцій організму, що виникають унаслідок опіків. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я, опіки посідають третє місце серед усіх видів травм мирного часу. Щороку у світі близько 6 млн осіб з опіковою хворобою потребують медичної допомоги.

У мирні часи в Україні кількість хворих на опікову хворобу, які потребують стаціонарного лікування, становила близько 80 тис. на рік, серед них приблизно 10 % – діти. Однак в умовах воєнних дій частота опікового травматизму та ступеня його тяжкості значно зростає. Середня тривалість перебування опікового хворого в стаціонарі становить близько двох тижнів, проте в разі масивних та глибоких опікових уражень стаціонарне лікування може тривати місяцями, і такі хворі часто потребують аутоотрансплантації.

Аутодермопластика, або аутоотрансплантація шкіри, при опіковій хворобі сприяє зниженню загроз для життя пацієнта, підвищує ефективність загоєння масивних опікових ран та поліпшує подальшу реабілітацію. Перед аутоотрансплантацією лікарі проводять підготовку ранового ложа з метою відновлен-

ня основи шкіри — дерми. Цей процес триває зазвичай близько тижня. Проте приблизно у 20–30 % опікових хворих, на жаль, спостерігається відторгнення аутоотрансплантатів. Найчастіше це трапляється в разі масивних та глибоких опікових ран, які займають більш як 30–40 % поверхні тіла, коли в організмі недостатньо внутрішніх ресурсів для забезпечення регенеративних процесів.

У сучасній медичній практиці в таких складних випадках застосовують як тимчасові еквіваленти всієї шкіри, які містять диференційовані клітини (фібробласти, кератиноцити), так і еквіваленти окремих її шарів (дерма, епідерміс). Найкращими вважаються тимчасові еквіваленти дермального шару шкіри, або дермальні покриття, що містять живі клітини, але вони дуже високовартісні, а отже, ними неможливо забезпечити всіх пацієнтів, які потребують аутоотрансплантації.

Слід зазначити, що еквівалентів шкіри, які задовольняли б усі вимоги клініцистів, особливо при лікуванні масивних опіків, наразі поки що не створено. Тому спеціалісти в усьому світі продовжують дослідження, спрямовані на розроблення нових тимчасових замінників шкіри з використанням сучасних підходів і матеріалів. Останнім часом при розробленні еквівалентів шкіри починають використовувати не лише диференційовані клітини шкіри, а й мезенхімальні стовбурові клітини (МСК).

Роботи зі створення дермальних еквівалентів шкіри розпочалися в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України ще в 2004 р. Тоді на ринку вже були наявні закордонні комерційні продукти, що містили клітинні компоненти, і кожен з них мав свої переваги й недоліки, але через надто високу вартість вони практично були недоступними для пацієнтів в Україні. Тому до нас звернулися хірурги-комбустіологи з проханням розробити ефективні й доступні за ціною вітчизняні тимчасові еквіваленти шкіри.

На першому етапі нашої роботи ми зосередили зусилля на отриманні нових еквівалентів дерми на основі носіїв природного та штучного походження з включенням мезенхімальних



Рис. 1. Натуральні колагенові мембрани, комерційний продукт «Білкозин»



Рис. 2. Синтетична поліакриламідна мембрана, продукт Інституту біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України

стовбурових клітин людини. На той час ми вже мали лінії МСК, одержані з периферійної крові здорових донорів. З натуральних матриць найкращими виявилися колагенові мембрани «Білкозин» (рис. 1) — комерційний продукт однойменного прилуцького заводу. Як синтетичні носії ми обрали поліакриламідні мембрани (кополімер акриламідів й акрилонітрил-5:3,N,N-метиленабісакриламідів) — продукт, який виробляють наші колеги з Інституту біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України (рис. 2).



Рис. 3. Клітини у складі гідрогелю на поверхні натуральної колагенової мембрани

Після попередньої спеціальної обробки на поверхню синтетичної поліакриламідної мембрани клітини наносили у вигляді суспензії в культуральному середовищі. При цьому клітини прикріплювалися до матриці, розпластувалися на ній і нормально зростали протягом кількох діб. Другий спосіб, який уможливує більш швидке приготування дермального покриття, полягав у нанесенні на поверхню натуральної колагенової мембрани клітин у складі гідрогелю (рис. 3). У цьому разі вже наступного дня отримані еквіваленти дерми можна було використовувати у медичній практиці.

На початку 2005 р. нам пощастило провести успішні клінічні випробування нашої розробки на базі Київського центру термічної травми і пластичної хірургії Київської міської клінічної лікарні № 2 під керівництвом і за безпосередньої участі головного комбустіолога професора Георгія Павловича Козинця. Виявилося, що аплікації створених нами штучних тимчасових покриттів значно прискорюють відновлення дерми у пацієнтів з масивними опіковими ранами. Якщо зазвичай процес підготовки ранового ложа триває близько тижня, то при застосуванні нових еквівалентів дерми вже на другу добу можна було проводити ауто-трансплантацію фрагментів шкіри пацієнта. При цьому на поверхню опікової рани пересажували перфоровані фрагменти шкіри, що дозволяло значно збільшити їхню площу.

Під час цих клінічних випробувань було отримано позитивні результати на десяти пацієнтах з масивними опіками. У всіх них спостерігалось пришвидшення процесу загоєння опікових ран. Так, при використанні нових дермальних еквівалентів скорочувалися терміни васкуляризації трансплантатів з 7–10 до 4–5 діб та епітелізації – з 12–14 до 7–8 діб; повна епітелізація наставала через 7–10 діб, тоді як зазвичай цей процес триває від 18 до 21 доби. Відторгнення ауто-трансплантатів не було зафіксовано (на відміну від 20–30 % випадків, які трапляються в клінічній практиці без використання тимчасових дермальних еквівалентів). І навіть рубці після загоєння ран були відсутні.

Наша співпраця з клініцистами розвивалася, аж поки в Україні не змінили нормативну базу щодо порядку впровадження нових препаратів та методів лікування. Наказ Міністерства охорони здоров'я України № 944 від 14.12.2009 «Про затвердження порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів» вимагав проведення доклінічних досліджень щодо ефективності та безпечності дермальних покриттів, які містять клітини, на експериментальних тваринних моделях.

Після певної перерви, у 2015 р., в рамках наукових програм НАН України ми започаткували проведення регулярних доклінічних досліджень *in vivo* розроблених нами еквівалентів дерми, що містять клітинний компонент. Як модельних тварин використовували два види гризунів – лінійних мишей та щурів. З моделями на мишах лінії ICR ми працювали на базі віварію Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, а з моделями на білих лабораторних щурах лінії Wistar – наші колеги з Науково-навчального центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка під керівництвом професора Тетяни Володимирівни Берегової. Отже, на другому етапі нашої роботи доклінічні дослідження нових дермальних еквівалентів здійснювали дві наукові групи паралельно.

Насамперед ми дослідили динаміку загоєння опікових ран III ступеня у модельних тварин під впливом препаратів, що містили клітини людини різних ліній: мезенхімальні стовбурові клітини лінії 4BL, фібробласти шкіри лінії A102 і клітини ембріонального походження лінії E8. Клітинну лінію 4BL було отримано в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України за розробленою нами методикою виділення МСК з периферійної крові здорових донорів. Виявилося, що всі дермальні покриття, які містять клітини, прискорювали загоєння ран у тварин порівняно з контрольними групами, проте найефективнішими були клітини лінії 4BL, оскільки вони помітно сприяли процесу загоєння опікових ран саме на ранніх, найбільш критичних стадіях.

Слід зазначити, що ми проводили ці експерименти з клітинами людини, використовуючи при цьому тваринні моделі, тобто це по суті була ксенотрансплантація, коли не відбувається замісна терапія, а дія препарату зумовлена біологічно активними речовинами, які генерують самі клітини. Тому у нас з'явилася ідея — спробувати взагалі обійтися без клітин, замінивши їх на культуральні середовища, кондиційовані стовбуровими клітинами. При вирощуванні в культурі МСК синтезують і виділяють у культуральне середовище ростові фактори та інші біологічно активні речовини.

Порівняння дії безклітинних кондиційованих середовищ (БКС) і препаратів з клітинами засвідчило, що в разі фібробластів шкіри лінії A102 ефективність є зрівняною, в разі клітин ембріонального походження E8 кондиційовані середовища показали гірший результат, ніж клітини, а в разі МСК кондиційоване ними середовище виявилось навіть ефективнішим, ніж самі клітини. Ці дані підтвердилися на двох видах модельних тварин, тому надалі ми зосередили свою увагу саме на середовищах, кондиційованих стовбуровими клітинами лінії 4BL.

У серії дослідів було показано пришвидшення загоєння опікових ран і росту шерсті у модельних тварин після обробки опікових ран безклітинним кондиційованим середовищем

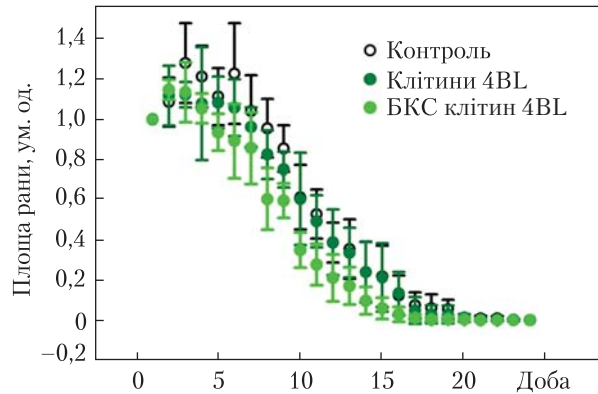


Рис. 4. Динаміка загоєння опікових ран у модельних тварин з використанням препаратів, що містять або клітини 4BL, або безклітинні кондиційовані середовища БКС-4BL

БКС-4BL, що містить комплекс біологічно активних речовин, синтезованих відповідними клітинами лінії 4BL, порівняно з контролем (без обробки) та з обробкою препаратом, що містить клітини (рис. 4).

Потім ми вивчили безпечність зразків БКС-4BL, тобто їх можливу гостру та субхронічну токсичність, на піддослідних тваринах. У результаті смертності серед модельних тварин та клінічних проявів інтоксикації не було зафіксовано, а всі патоморфологічні, гематологічні та біохімічні показники перебували в межах норми. Отже, зразки БКС-4BL є придатними для виготовлення нових біотехнологічних дермальних покриттів медичного призначення.

Підбиваючи підсумки другого етапу наших досліджень, слід підкреслити, що запропоновані нами нові дермальні покриття є доступними у виготовленні та зручними у використанні. Їх отримують з природних і недорогих матеріалів з включенням біологічно активних компонентів: стовбурових клітин людини оригінальної лінії 4BL або їхніх похідних — безклітинних кондиційованих середовищ. Компоненти клітинного походження (клітини та БКС) можна зберігати окремо від носіїв за температури -80°C . Далі ці компоненти поміщають у м'який гідрогель (на основі желатини, карбополу та ін.), який можна наносити або

безпосередньо на рану як мазь, або спочатку на твердий носій — природну колагенову чи синтетичну мембрану, а вже потім на рану.

На спосіб отримання нових ефективних та безпечних еквівалентів дерми, що містять клітини або БКС, отримано 4 патенти України. За результатами проведених досліджень захищено 2 кандидатські дисертації.

На третьому етапі роботи (фінансування Національного фонду досліджень України) ми отримали ліофілізовані порошки безклітинних кондиційованих середовищ з використанням різних наповнювачів і показали, що їх водні розчини мають високу терапевтичну ефективність у лікуванні опіків, прискорюючи загоєння опікових ран. Це дуже важливо, оскільки такі ліофілізовані порошки БКС можна зберігати у звичайному холодильнику і в разі потреби легко та швидко приготувати з них дермальні покриття.

Крім того, на цьому етапі ще одним удосконаленням нашого продукту стало введення додаткового фармацевтичного композиту, який містить препарат ізатизон з антисептичною, противірусною та імуномодулювальною дією та рекомбінантний білок цитокін ЕМАР II, який також має імуномодулювальні властивості й регулює процеси утворення та росту судин. Ізатизон і цитокін ЕМАР II виробляють у нашому Інституті, а саме, у відділі білкової інженерії та біоінформатики під керівництвом професора Олександра Івановича Корнелюка.

Досліди на модельних тваринах засвідчили, що застосування дермального покриття, що містить комплекс БКС+ізатизон+ЕМАР II, дозволяє уникнути інфікування опікових ран під час лікування. При цьому вже на 7-му добу спостерігається стимуляція васкуляризації в зоні ранового ложа та зменшення кількості деяких регуляторних білків, відповідальних за процес запалення, майже до рівня, який характерний для здорових тварин. Було також доведено відсутність токсичних ефектів при застосуванні комбінованих еквівалентів дерми, коли в їхньому складі поєднано компонент клітинного походження і фармацевтичний композит.

Серед переваг використання кондиційованих середовищ замість живих клітин, які є продуцентами комплексу біологічно активних речовин, насамперед слід відзначити такі:

- істотне зменшення собівартості препарату;
- спрощення процедури зберігання;
- відсутність необхідності введення кріопротекторів під час зберігання;
- можливість швидкого приготування покриття безпосередньо перед його застосуванням;
- зручність у використанні;
- полегшення процедур контролю безпеки;
- запобігання контамінації патогенами;
- спрощення процесу стандартизації технології отримання препарату;
- можливість уникнути потенційних ризиків, пов'язаних з трансплантацією клітин, що культивуються.

Отже, в Інституті молекулярної біології і генетики НАН України створено новий вітчизняний біотехнологічний продукт — еквівалент дерми, або дермальне покриття, для лікування тяжких опікових ран, який поєднує високу ефективність з відносно низькою собівартістю. У дослідах на модельних тваринах не було виявлено ознак токсичної дії нових дермальних покриттів та їх біологічно активних компонентів, що відкриває можливості для подальших клінічних випробувань.

Для впровадження нового біотехнологічного продукту в медичну практику передусім необхідно провести його незалежну сертифікацію в акредитованій токсикологічній лабораторії, а потім передати зразки нових еквівалентів дерми в медичні заклади, що спеціалізуються на лікуванні опікової хвороби і, можливо, й інших травматичних уражень шкіри, для проведення клінічних випробувань.

На завершення доповіді хочу висловити подяку всім, хто брав участь у цій роботі, — співробітникам Інституту молекулярної біології і генетики НАН України, Центру термічної травми і пластичної хірургії на базі Київської міської клінічної лікарні № 2, Інституту біологічної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України, ННЦ «Інститут біології та медицини» Київ-

ського національного університету імені Тараса Шевченка.

Дослідження фінансувалися в рамках цільових комплексних програм наукових досліджень НАН України «Молекулярні та клітинні біотехнології для потреб медицини, промисловості та сільського господарства» (2015–2019 рр.) та «Матеріали для медицини

і медичної техніки та технології їх отримання і використання» (2017–2021 рр.), а також проекту (реєстраційний номер 2020.01/0035) Національного фонду досліджень України (2020–2021 рр.).

Дякую за увагу!

*За матеріалами засідання
підготувала О.О. Мележик*

Ljubov L. Lukash

Institute of Molecular Biology and Genetics of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4522-1600>

CELLULAR BIOTECHNOLOGIES FOR THE DEVELOPMENT
OF NEW DERMAL EQUIVALENTS FOR THE TREATMENT OF MASSIVE BURNS

Transcript of scientific report at the meeting of the Presidium of NAS of Ukraine, October 5, 2022

The report is devoted to the results of long-term research conducted at the Institute of Molecular Biology and Genetics of the NAS of Ukraine on the development of new efficient and safe temporary dermal equivalents, or dermal coatings, for the treatment of massive burn wounds.