

Корисна модель належить до регенеративної медицини, а саме до дерматології, і може бути застосована для покращення стану шкіри хворих на псоріаз, акне та інші патологічні стани шкіри, зокрема, після ран та опіків, за допомогою мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) пуповини людини та продуктів їх життєдіяльності, а більш конкретно до способу отримання мезенхімальних стовбурових клітин пуповини людини і їх кондиціонованого середовища для відновлення уражень шкіри.

Псоріаз - це хронічне мультисистемне запальне захворювання, опосередковане імунною системою, яке переважно проявляється у вигляді проблем зі шкірою та/або суглобами, що характеризується червоними, лускатими плямами та бляшками. Будучи захворюванням системного запалення, псоріаз пов'язаний із множинними супутніми захворюваннями, включаючи серцево-судинні захворювання та злоякісні новоутворення. В Україні, за оцінками, на псоріаз хворіє близько 1 мільйона людей, що становить приблизно 2-3 % населення. Псоріаз може виникнути у будь-якому віці, але найчастіше вперше з'являється у підлітковому віці або у віці 50-60 років.

На сьогоднішній день патогенез псоріазу ще не до кінця вивчений, але відомо, що він проявляється через залучення генетичної схильності та екологічних факторів, що призводять до гіперреактивної імунної відповіді та аномального оновлення клітин шкіри. Цей процес призводить до утворення характерних червоних бляшок, що лущаться, характерних для псоріазу. Також відомо, що багато видів клітин, включаючи кератиноцити, Т-лімфоцити, дендритні клітини, нейтрофіли та макрофаги, відіграють вирішальну роль у патогенезі та прогресуванні псоріазу. Однак до цього часу роль кожного виду клітин у патогенезі та розвитку псоріазу систематично не вивчалася. Крім того, хоча антитіла, розроблені для впливу на цитокіни (наприклад, IL-23, IL-17A і TNF- α), що вивільняються цими клітинами, показали багатообіцяючі результати в лікуванні пацієнтів з псоріазом, ці цільові антитіла досі не виліковують до кінця псоріаз і забезпечують лише короточасний ефект. Більше того, відомо, що тривале застосування цих антитіл надає несприятливий фізичний та психологічний вплив на пацієнтів з псоріазом.

На сьогоднішній день, в залежності від тяжкості захворювання може бути назначене лікування: при легкому та помірному ступені захворювання терапія першої лінії включає місцеву терапію, що включає кортикостероїди, аналоги вітаміну D3 та комбіновані препарати, а пацієнтам з більш тяжкими та рефрактерними симптомами призначається системна терапія для зменшення запалення, очищення шкіри від уражень, покращення якості життя та запобігання ускладнень.

Акне - хронічне запальне захворювання шкіри, яке вражає волоссяно-сальні залози, що зазвичай характеризується тривалим перебігом у вигляді білих та чорних вугрів, папул, твердих болючих утворень під шкірою та кістозних уражень. Зазвичай захворювання провокується у підлітковому віці бактерією *Cutibacterium acnes* під впливом нормального рівня циркулюючого дегідроепіандростерону. Це поширене захворювання шкіри, яке може виявлятися як запальними, так і незапальними ураженнями.

На 2024 рік статистичні дані указують на те, що на акне страждають до 80 % населення у віці 12-16 років - висипання з'являються у період статевого дозрівання. Після 18-20 років у частини людей вони зникають, однак нерідко проблеми продовжується у дорослому віці. Понад 50 % жінок 20-30 років страждають від акне, у віці 30-40 років цей відсоток становить 33 %, а після 40 років близько 25 % жінок скаржаться на періодичні висипання.

Лікування акне залежить від його тяжкості та причин виникнення: при легкій формі застосовуються м'які без сульфатні гелі, некомедогенні креми; при середній формі додатково назначаються місцеві засоби з саліциловою кислотою, ретиноїдами, а при важкій формі вже залучаються системні антибіотики. На жаль, всі ці методи лікування не дають швидкого ефективного відновлення шкіри, лише тимчасове, довгострокова системна терапія призводить до певного зменшення запалення.

Патологічні стани шкіри, які виникають внаслідок термічних, хімічних опіків або вибухових травм часто супроводжуються пошкодженням епідермісу, дерми та глибших тканин. Наслідки залежать від глибини та площі ураження, а також від індивідуальних особливостей регенерації: рубцеві зміни, пігментні пошкодження, порушення трофіки і чутливості, поява контрактур, поява хронічних виразок та бактеріальних інфекцій. Залежно від тяжкості ступеня опіку, розроблені схеми лікування: силіконові гелі, кортикостероїдні ін'єкції, трансплантація шкіри, лазерна та фізіотерапія тощо.

В останнє десятиріччя все більшу увагу привертає використання клітинної терапії з метою лікування різноманітних уражень шкіри. Значне місце в такій терапії займає застосування мезенхімальних стовбурових/стромальних клітин з різних джерел, отриманих за допомогою різноманітних способів.

Відомий спосіб культивування мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), отриманих з пуповини людини. Спосіб полягає у виділенні МСК та введенні їх в поживне середовище DMEM з додаванням тромболізату (ТЛ) пуповинної крові [Патент України №51214 У, Опубл. 12.07.2010, Бюл. № 13]. Недоліками описаного способу є використання для отримання МСК колагенази, яка є ксеногенним матеріалом. При цьому, порції пуповинної крові є невеликими за об'ємом, що не дозволяє

напрацьовувати достатню кількість МСК. Крім того, отримання тромбоцитарної маси та її активування є досить трудомістким процесом, а застосування її від одного донора не забезпечує стандартності у зв'язку з гетерогенністю донорів.

Відомий також спосіб одержання комплексного біотехнологічного продукту, що містить позаклітинні везикули від трьох типів клітин-продуцентів, для відновлення дефектів м'яких тканин [Патент України № 155352 U, публікація відомостей про державну реєстрацію: 21.02.2024, Бюл. № 8]. Даний спосіб оснований на використанні трьох джерел МСК, культивування яких проводять із застосуванням різних середовищ. Недоліком даного способу є використання додаткових факторів при культивуванні МСК пульпи зуба (епідермального фактору росту (EGF), інсулін-трансферин-селену), які не є специфічними для усунення запалення і підвищення регенеративних властивостей клітин і їх продуктів, що є важливим для усунення дерматологічних проблем, а скоріше для проліферації клітин. В той же час, дані препарати є досить дорогими. Крім того, спосіб, який пропонується для очистки кондиціонованого середовища (ультрацентрифугування), призводить до збіднення кінцевого продукту і потребує спеціального обладнання. Додаткове використання фібринового гелю для селекції клітин пульпи зуба, як пропонується у даному способі, удорожчує і ускладнює метод.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб отримання мезенхімальних стовбурових клітин пуповини людини і їх кондиціонованого середовища для відновлення уражень шкіри, який би дозволив створити більш доступний кінцевий препарат, який буде специфічно усувати запалення і сприяти регенерації шкіри.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб отримання мезенхімальних стовбурових клітин пуповини людини і їх кондиціонованого середовища для відновлення уражень шкіри, за яким одержують мезенхімальні стовбурові клітини методом експлантів, згідно з корисною моделлю, при культивуванні мезенхімальних стовбурових клітин за добу до прекодиціювання клітин в культуральне середовище додають альфа-інтерферон до кінцевої концентрації 100 од./мл, а після доби культивування в його присутності проводять заміну середовища на середовище без сироватки і прекодиціювання мезенхімальних стовбурових клітин дитіотреїтолом в концентрації 100 мкМ протягом 12 годин.

Спосіб отримання мезенхімальних стовбурових клітин пуповини людини і їх кондиціонованого середовища, збагаченого продуктами життєдіяльності клітин, для відновлення уражень шкіри здійснювали наступним чином. Клітини виділяли з пуповини, після інформованої згоди породіль методом експлантів. Матеріал оброблявся не пізніше, ніж через 5 годин після пологів. Пуповини витримували у 10-кратному розчині антибіотиків (пеніцилін-стрептоміцин) протягом 30-40 хвилин при кімнатній температурі, після чого видаляли судини, а матрикс подрібнювали на шматочки, розміром 0,2-0,5 см², які вміщували в поживне середовище DMEM/F12 з додаванням 10 % ембріональної сироватки телят (ETC), 2мМ L-глутаміна та 5 нг/мл FGF-β, а також антибіотиків в звичайних концентраціях - 100 од./мл пеніциліну та 100 мг/мл стрептоміцину. Заміну середовища проводили на кожну третю добу, пересів клітин, які вийшли зі студня та утворили клони, виконували за допомогою розчину трипсин-Версен при досягненні клітинами ступеню конфлуентності 80 %. Для цього культуральне середовище зливали, моношар клітин двічі промивали фізіологічним розчином і заливали сумішшю 0,5 % трипсину і 0,02 % розчину Версена в рівних кількостях в об'ємі, який покривав моношар. Клітини вигримували при 37 °С, періодично контролюючи під мікроскопом їх відкріплення лзід поверхні пластикового посуду. Коли клітини ставали округлими, основну кількість розчину зливали, а клітини ретельно, але край акуратно, суспендували за допомогою автоматичної піпетки. Після отримання гомогенної суспензії, клітини підраховували в камері Горяєва і висівали на наступний пасаж в кількості 5000клітин/см². Таким саме чином, проводили наступне пасажування МСК, і в роботі використовували клітини другого пасажу в культурі, перевірені наявністю характерної для МСК веретеноподібної морфології та охарактеризовані за поверхневими маркерами, класичними для МСК-CD73, CD90, CD 105 (позитивні) та CD34 (негативний). Експресію поверхневих маркерів вимірювали за допомогою методу проточної цитометрії (FACS). Аналіз проводився згідно стандартних протоколів з використанням антитіл, мічених FITC (CD34, CD90, CD 105) або PE (CD73).

Клітини культивували протягом 2 пасажів в культурі. Після досягнення 80 відсотків конфлуентності 2-го пасажу в середовище додавали альфа -інтерферон до концентрації 100 од./мл для підсилення протизапальної дії МСК і культивували протягом доби. Після цього проводили заміну середовища на чисту DMEM/F12 без сироватки і інших інгредієнтів з попереднім двократним відмиванням моношару клітин фізіологічним розчином. В замінене середовище додавали дитіотреїтол (ДТТ) до концентрації 100 мкМ для підсилення регенеративної дії МСК і проводили прекодиціювання даним агентом протягом 12 годин, після чого середовище зливали і центрифугували для видалення дебрису при 1000 об./хв протягом 15 хвилин, а моношар клітин відкріплювали від поверхні звичайним способом, центрифугували 20 хвилин при 1000 обертів та ресуспендували в невеликому об'ємі фізрозчину та підраховували.

Клітини змішували з 2% теплим розчином желатину в середовищі DMEM/F12, ретельно

перемішували і зберігали при +4 °С до використання, але не довше 5 діб. Кондиціонат зберігали за тих самих умов.

Отримані модифіковані МСК, який в поєднанні з желатином являють собою стерильний гель, що при зберіганні при +4 °С має щільну форму, а при нагріванні до 37 °С перед застосуванням стає рідким. Фасування можливе за потребою від 1 до 20 мл, зберігання не більше 5 діб при +4 °С. Кондиціонат являє собою кондиціоноване середовище МСК, збагачене продуктами життєдіяльності цих клітин. Препарат фасують по 5-50 мл, розчин стерильний, має рожевий колір (як і середовище), зберігається при +4 °С, використовується вся фасовка одночасно. Продукти транспортують на холоді при +4...+8 °С.

Приклад 1

Пацієнт, 35 років, з діагнозом: псоріаз вульгарний (бляшковий). У пацієнта спостерігались псоріатичні бляшки з запальними червоними бляшками на шкірі ліктів, колінах та волосяній частині голови, також пацієнт скаржився на свербіж та сухість шкіри. Було назначене системне введення (з клізмою) кондиціонованого середовища та локальне нанесення МСК, отриманих пропонуваним способом. Об'єм введенного кондиціонату складав 30 мл. Клітини в розчині желатину нагрівали при 37 °С, щоб отримати рідкий стан суміші, і наносили на уражені частини шкіри на 30 хвилин, після чого шкіру витирали сухою серветкою. Після виконаної процедури вже через 3 дні спостерігалось зменшення лущення шкіри, сухість та свербіж зник, запалення шкіри помітно зменшилось. Через 14 днів загальний стан пацієнта був задовільний, нові червоні бляшки не з'являлись, колір уражених частин шкіри відповідав нормі без запальних ознак, лущення шкіри на старих бляшках зменшилось і спостерігалось поступове заміщення епідермісу без ознак гіперкератозу, шкіра стала більш еластичною, що свідчить про її відновлення.

Приклад 2

Пацієнту, 48 років, проведено лазерну шліфовку обличчя на глибину 0,5 мм за допомогою вуглекислотного CO₂ SWISSMEDCO₂ лазера. Одразу після процедури спостерігалось значне почервоніння, припухлість обличчя, мали місце значні больові відчуття. На оброблену поверхню шкіри нанесені клітини, отримані за описаною методикою, та ректально вводили препарат кондиціонату, отриманий за запропонованим способом. Вже через 2 години больові відчуття відсутні, опіки на обличчі не спостерігаються, почервоніння має місце лише в окремих місцях.

Запропонований спосіб забезпечує ефективне відновлення шкіри шляхом його використання, за рахунок використання при культивуванні клітин двох факторів - альфа-інтерферону, який підсилює протизапальні властивості МСК, та ДТТ, який відомий як потужний відновлювальний агент, що сприяє регенерації клітин, особливо після пошкодження, захищаючи стовбурові/прогениторні клітини, сприяючи відновленню тканин.