

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

ННЦ «Інститут біології та медицини»
Кафедра цитології, гістології та
репродуктивної медицини

Завідувач кафедри професор Микола Держинський

Протокол № ____ засідання кафедри

від “__” _____ 2023 р.

**МОЖЛИВОСТІ ВИКОРИСТАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ
СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ПУПОВИНИ ПРИ ДІАБЕТ-
АСОЦІЙОВАНІЙ ЕРЕКТИЛЬНІЙ ДИСФУНКЦІЇ**

Кваліфікаційна робота магістра
денної форми навчання
за спеціальністю 091 Біологія
Кащук Ольги Анатоліївни
Науковий керівник від кафедри
Кандидат біологічних наук, доцент
Рибальченко Т.В.

Робота виконана під керівництвом завідувача біотехнологічною лабораторією Банку пуповинної крові, тканин та інших клітин людини «Медичного центру «М.Т.К.»» Пихтєєва Д.М.

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ADSC – стовбурові клітини, виділені з жирової тканини

BMSC – стовбурові клітини, виділені з кісткового мозку

CD31 – глікопротеїн, ендотеліальний маркер

DPP4 – дипептидилпептидаза-4

FGF – фактор росту фібробластів

GIP – інсулінотропний поліпептидний гормон

GLP-1 – глюкагоноподібний пептид-1

HbA1c – глікозильований гемоглобін

hPSC – плюрипотентні стовбурові клітини людини

HUCMSC – мезенхімальні стовбурові клітини, виділені з пупкового канатика людини

PDE5 – фосфодіестераза-5

SGLT2 – котранспортер-2 натрій-глюкози

VEGF – вегетативний фактор росту ендотелію

БАМ – біологічно активні молекули

ЕД – еректильна дисфункція

ІМТ – індекс маси тіла

МСК – мезенхімальні стовбурові клітини

СК – стовбурові клітини

ФСК – фетальні стовбурові клітини

ЦД – цукровий діабет

ЗМІСТ

ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1	6
ПРИЧИНИ, НАСЛІДКИ ТА ТЕРАПІЯ ДІАБЕТ-АСОЦІЙОВАНОЇ ЕРЕКТИЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ	6
1.1. Патогенез цукрового діабету II типу	6
1.2. Еректильна дисфункція – ускладнення, що значно погіршує якість життя	8
1.3. Сучасні терапевтичні методики	11
1.4. Клітинна терапія – альтернативний метод лікування ускладнень цукрового діабету	17
РОЗДІЛ 2	22
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	22
2.1. Етико-правові норми проведення експерименту	22
2.2. Вибір учасників дослідження	22
2.3. Оцінка якості клітинного продукту	26
2.4. Схема введення клітинного препарату	28
2.5. Оцінка ефективності клітинної терапії	29
2.6. Статистична обробка	31
РОЗДІЛ 3	32
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	32
3.1. Виготовлення клітинного продукту	32
3.2. Відновлення еректильної функції	40
ВИСНОВКИ	51
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	52

ВСТУП

Цукровий діабет II типу згубно впливає на функціонування і загальний стан організму. порушення виявляється не тільки на цитологічному та гістологічному рівнях, а й відображається на роботі усіх систем організму, впливає на рівень життя та психологічний стан особин. Часто ЦД II типу супроводжується серцево-судинними захворюваннями, діабетичною ретинопатією, нирковою недостатністю, ішімізацією кінцівок, підвищеним ризиком когнітивної дисфункції та деменції (через хворобу Альцгеймера та судинну деменцію), акантокератермією, сексуальною дисфункцією, зниженням імунітету. Більшість пацієнтів мають принаймні одне ускладнення, яке явно знижує рівень життя й може призвести до смерті [1]. Еректильна дисфункція виникає на 10–15 років раніше у чоловіків з діабетом і часто є більш серйозною та пов'язується з нижчою якістю життя. Взагалі для більшості ендокринних порушень характерні відсутність або зниження лібідо та порушення сексуального здоров'я. Окремо варто сказати про те, що вищенаведені ускладнення все частіше зустрічаються у людей молодшого віку [2].

На сьогоднішній день є ряд терапевтичних методик, які набули широкого застосування, але все ще потребують певного удосконалення. Альтернативною терапією може стати введення стовбурових клітин – внутрішньовенне й інтракаверозне [3]. Певний позитивний ефект від використання даного методу вже доведений, а нові дослідження допоможуть вказати на можливі недоліки та необхідні зміни. Можна припустити, що певний ефект будуть також мати: речовини, які продукуються стовбуровими клітинами; різноманітні фактори росту; препарати, які сприяють проліферації та диференціації клітин; деякі вітаміни тощо [4].

Метою даної роботи є вивчення впливу клітинного препарату мезенхімальних стовбурових клітин пупкового канатика на відновлення еректильної функції в чоловіків з цукровим діабетом II типу.

Предметом дослідження є аналіз впливу клітинної терапії на зменшення проявів діабет-асоційованої еректильної дисфункції. Об'єктом дослідження – мезенхімальні стовбурові клітини пуповини та показники тканинної регенерації.

На основі вищезазначених фактів, можна зробити висновок про однозначну актуальність пошуку, розробки і удосконалення методів лікування еректильної дисфункції. Не дивлячись на достатню кількість досліджень в цій області, сучасний світ вимагає нових відкриттів, а нові методи біології, медицини та інших галузей науки дають змогу вивести дослідження на новий рівень. Варто наголосити, що нові методи не тільки допоможуть пригальмувати розвиток судинних ускладнень ЦД II типу (до яких можна віднести еректильні проблеми) та продовжать тривалість повноцінного життя, а й будуть важливим надбанням при лікуванні багатьох травм та їх наслідків.

РОЗДІЛ 1

ПРИЧИНИ, НАСЛІДКИ ТА ТЕРАПІЯ ДІАБЕТ-АСОЦІЙОВАНОЇ ЕРЕКТИЛЬНОЇ ДИСФУНКЦІЇ

Розробка методики лікування еректильних проблем, що виникають внаслідок ендокринологічного порушення, потребує попередньої обробки великих масивів тематичної літератури. На сьогоднішній день є декілька описаних стандартних методик, які застосовуються в лікарській практиці – детальне їх вивчення допоможе виділити основні переваги й недоліки кожної та знайти альтернативні шляхи подолання проблеми.

1.1. Патогенез цукрового діабету II типу

Цукровий діабет — група ендокринних захворювань, які розвиваються внаслідок абсолютної або відносної недостатності гормону інсуліну і характеризуються стійким збільшенням вмісту глюкози в крові. Виділяють цукровий діабет 1 та 2 типів. Для ЦД 2 типу характерний високий рівень глюкози в крові за умови резистентності до інсуліну та відносної його недостатності. Цим він відрізняється від ЦД 1 типу, за якого існує цілковита нестача інсуліну через руйнування інсулоцитів у підшлунковій залозі. Діабет 2-го типу становить близько 90% випадків діабету, а причинами його розвитку вважається поєднання чинників способу життя та генетики. Так, збільшення індексу маси тіла – основна причина виникнення серед людей, що мають генетичну схильність до захворювання [5, 6]. Найпоширеніші в популяції форми є полігенними – викликані змінами в кількох генах (наприклад, алель TCF7L2 підвищує ризик розвитку в 1,5 рази), але є рідкісні випадки, які спричинені мутацією одного гена – моногенний діабет. Більшість цих генів пов'язані з діяльністю бета-клітин. Режим харчування матері протягом періоду

розвитку плоду також може зіграти свою роль, оскільки одним із вірогідних механізмів є змінена метиляція ДНК [7]. На сьогодні вже доведено, що зміна складу мікробіоти здатна змінити кишкові бар'єрні функції та індукувати метаболомічні та сигнальні шляхи, пов'язані з резистентністю до інсуліну [8]. Довгий час ЦД 2 типу частіше виявляли у дорослих та літніх людей, що було логічно – з віком збільшується резистентність до інсуліну (зменшення відношення кількості м'язової тканини до жирової, недостатня компенсація функції бета-клітин у процесі підвищення інсулінорезистентності), знижується метаболізм, фізична активність [9]. Сучасні огляди вказують на значне «омолодження» даного захворювання – малорухливий спосіб життя, гормональні порушення, куріння тощо призвели до збільшення кількості хворих. Усе частіше фіксують появу діабету 2 типу в підлітків та дітей [2, 10]. ЦД 2 типу у дітей і підлітків є серйозною медичною проблемою, бо його форма є більш агресивною, ніж у дорослих, його важче діагностувати та є обмеження в застосуванні терапії (малоефективна при хронічному перебігу у дітей). Серед молоді спостерігається висока поширеність ускладнень і супутніх захворювань, тому раннє виявлення та лікування є життєво важливими [10].

Класичними симптомами діабету є поліурія, постійна надмірна спрага, поліфагія та втрата ваги, додатково можуть спостерігатись: розфокусований зір, шкірні захворювання, периферійна невропатія, періодичні вагінальні інфекції та втома в анамнезі. Багато людей не мають виражених симптомів протягом перших років і хвороба діагностується під час планового обстеження. Внаслідок підвищення рівня глюкози в крові виникає ряд супутніх патологічних станів – це захворювання серця (в 2-4 рази вищий ризик серцево-судинних захворювань, в тому числі ішемічної хвороби серця), інсульту, діабетична ретинопатія (супроводжується зниженням зору), ниркова недостатність, ішімізація кінцівок (в 20 разів вищий ризик ампутації нижніх кінцівок та підвищений ризик госпіталізації), підвищений ризик когнітивної дисфункції та деменції (через хворобу Альцгеймера та судинну деменцію), акантокератермія, сексуальна дисфункція, часті інфекції тощо [1]. В рідких

випадках може статися некетоацидотична гіперосмолярна кома. Госпіталізація показана при гострих проявах діабетичних ускладнень (різке погіршення зору, загострення ішемічної хвороби серця, трофічні зміни на нижніх кінцівках тощо) в ендокринологічний стаціонар або у стаціонар відповідного профілю незалежно від показників вуглеводного обміну. Більшість пацієнтів із ЦД 2 типу мають принаймні одне ускладнення, яке явно знижує рівень життя й може призвести до смерті. Подібні наслідки роблять діабет 2 типу небезпечним захворюванням, що негативно впливає на якість та тривалість життя [1].

1.2. Еректильна дисфункція – ускладнення, що значно погіршує якість життя

Для підтримання належного рівня життя пацієнтів з ЦД, активно застосовують ліки, які зменшують або усувають симптоми викликаних ускладнень. Обстеження хворих проводять спеціалісти відповідного профілю під наглядом ендокринолога – раннє виявлення ускладнень є важливим, оскільки раннє терапевтичне втручання призводить до кращих результатів. Найчастіше така терапія проводиться для зниження розвитку серцево-судинних факторів ризику, що значно покращує рівень життя, психосоціальний стан та загальну тривалість життя пацієнта (адже гіперглікемія, резистентність до інсуліну та надлишок жирних кислот збільшують окислювальний стрес, порушують передачу сигналів протеїнкінази C і збільшують кінцеві продукти глікації, що призводить до судинного запалення, вазоконстрикції, тромбозу та атерогенезу) [11]. Хронічна гіперглікемія вкрай негативно впливає на мікроциркуляторне русло, що зрештою призводить до діабетичної нефропатії, ретинопатії та нейропатії. До мікросудинних порушень можна віднести й сексуальну дисфункцію –

ускладнення ЦД 2 типу, яке часто ігнорується, зі складним патогенезом, що походить від ендотеліальної дисфункції [12, 13]. Причинний вплив окремих факторів ризику метаболічного синдрому на ЕД досі не з'ясований. Деякі джерела наголошують на тому, що перші симптоми еректильної дисфункції при ЦД 2 типу навіть можуть передувати появі діабетичних симптомів.

Еректильна дисфункція — тривале (більше одного місяця) порушення статевої функції у чоловіків, що характеризується неспроможністю досягти та утримувати ерекцію статевого члена, достатню для проведення задовільного статевого акта. Хронічні захворювання (атеросклероз, цукровий діабет, серцево-судинна патологія, печінкова недостатність), неврологічні хвороби (розсіяний склероз, хвороба Альцгеймера), захворювання статевого члена (хвороба Пейроні), психічні розлади (депресія), ендокринні захворювання (цукровий діабет, гіпогонадізм, гіперпролактинемія), прийом медикаментів (гіпотензивні, антидепресанти, гормональні препарати), стиль життя (адинамія, вживання алкоголю, тютюнопаління, наркоманія) можуть викликати порушення статевої функції. Еректильна дисфункція виникає на 10–15 років раніше у чоловіків з діабетом і часто є більш серйозною та пов'язується з нижчою якістю життя. Взагалі для більшості ендокринних порушень характерні відсутність або зниження лібідо та еректильна дисфункція. Ерекція статевого члена здійснюється двома механізмами: рефлекторної ерекції, яка безпосередньо стосується статевого члена і психогенної ерекції (статевого потягу, лібідо), яка досягається за рахунок еротичного чи емоційного подразника. Стимуляція статевого члена в нервовій системі призводить до секреції оксиду азоту (NO), який викликає розслаблення гладкої мускулатури кавернозних тіл (основна еректильна тканина статевого члена) й наступну ерекцію статевого члена. Склерозування кавернозної тканини у чоловіків старечого віку, при цукровому діабеті, пріапізмі, травмі унеможлиблює цей процес. Крім того, потрібний адекватний рівень тестостерону (гормон, що виробляється в яєчках) для розвитку здорової системи ерекції. Варто зазначити, що рівень тестостерону змінюється при ЦД

2 типу – епідеміологічні дослідження демонструють, що знижений рівень тестостерону в сироватці крові є поширеним не лише у чоловіків із встановленим діабетом 2 типу, але й може вказувати на ризики виникнення діабету в майбутньому. Є певна кореляція між низьким вмістом тестостерону й підвищеним ризиком смертності в хворих на ЦД. Доклінічні дослідження вказують на вірогідні механізми, за допомогою яких низький рівень тестостерону може спричиняти дисглікемію. У деяких дослідженнях лікування екзогенним тестостероном послідовно зменшує жирову та збільшує м'язову масу й зменшує резистентність до інсуліну, але більшість доступних на даний момент рандомізованих контрольованих досліджень не повідомляють про постійну користь препарату [14]. Як можна зрозуміти з механізмів нормальної ерекції, імпотенція може розвинути через гормональну недостатність, розлади нервової системи, психологічні проблеми, відсутність нормального кровопостачання статевого члена. Пацієнти з ЦД 2 типу не тільки мають гормональні порушення та судинні захворювання, а й часто страждають через ряд психосоціальних проблем та низьку якість життя. Статеві розлади вважаються одним із найпоширеніших ускладнень цукрового діабету і проявляються змінами всіх складових копулятивного циклу — статевого потягу, ерекції, еякуляцій та оргазму. Крім хвороби, еректильну дисфункцію можуть спричиняти також ліки, зокрема: препарати, що приймають при гіпертензії (яка часто супроводжує хворих на ЦД 2 типу) та засоби для зменшення апетиту (ті, що можуть приймати в разі ожиріння).

За даними Faselis діабетична нефропатія та ретинопатія вражають приблизно 25% пацієнтів із ЦД 2 типу; діабетична нейропатія зустрічається майже у 50% хворих на цукровий діабет, тоді як поширеність еректильної дисфункції коливається від 35 до 90%. Тривалість діабету, глікемія, підвищення артеріального тиску є загальними факторами ризику розвитку наведених ускладнень [12]. За даними Tamrakar, поширеність еректильної дисфункції з різним ступенем тяжкості виявилася у 76,87% пацієнтів із ЦД 2

типу [15]. Значно збільшує ризики розвитку ЕД і дисліпідемія – встановлено, що імовірність наявності дисліпідемії серед пацієнтів із ЦД 2 типу з ЕД у 2,3 рази вища, ніж у пацієнтів без. Шанси виникнення ЕД збільшуються приблизно в 3 рази при аномальному рівні ліпопротеїнів високої щільності та в 2,7 рази при аномальному рівні ліпопротеїнів низької щільності [16]. Отже, широке розповсюдження ЕД серед хворих на ЦД чоловіків потребує пошуку ефективного лікування.

1.3. Сучасні терапевтичні методики

Існує декілька стандартизованих методик лікування, які не тільки намагаються усунути основну ознаку – підвищений рівень глюкози, а й впливають на симптоматичні наслідки.

Основним методом боротьби з діабетом 2-го типу на ранній стадії є регуляція способу життя: фізичні вправи, нутрицевтичні втручання, відсутність шкідливих звичок. Ці первентивні заходи, в першу чергу, пропонуються тим, хто перебуває у групі ризику – має незадовільний сімейний анамнез або певні генетичні маркери. Висока кореляція виникнення захворювання з ожирінням вказує на важливість дотримання правильного способу життя й режиму харчування. Є дані, що веганська дієта корелює з меншим рівнем захворюваності на ЦД 2 типу, а у хворих сприяє зниженню рівня глюкози та покращує її гомеостаз. Дослідження включало понад 60 000 суб'єктів віком 30 років і старше – поширеність ЦД 2 типу була найвищою серед невегетаріанців (7,6%), а найнижчою – у веганів (2,9%). Проміжні значення демонстрували напіввегетаріанців (6,1%) та лактовегетаріанці (3,2%). Було зазначено різницю в середньому ІМТ між веганами та невегетаріанціями (більше 5 одиниць), але навіть після коригування ІМТ та інших змінних (вік, стать, етнічна приналежність, освіта, фізична активність,

кількість сну, вживання алкоголю) вегани мали менший ризик ЦД2 (відношення шансів 0,51; 95% довірчий інтервал 0,40–0,66) [17]. Отже, веганська дієта може бути корисною і при фармакологічній терапії ЦД 2 типу, але важливо споживати достатні кількості білка, вітамінів, макро- та мікроелементів. Також варто не забувати про стабільний режим харчування та ізокалорійний розподіл енергетичної цінності харчового раціону. Паралельно з нутрицевтичними змінами потрібно вести активний спосіб життя. Хворі на ЦД 2 типу можуть мати підвищену втомлюваність, що заважатиме займатись спортом, але незначні навантаження теж зможуть покращити загальне самопочуття. Малорозповсюдженим але ефективним є інвазивний хірургічний метод зменшення маси тіла [18]. Після операції пацієнти можуть використовувати медикаментозну терапію або регулювати спосіб життя, завдяки чому віддалена летальність зменшиться, хоча існує ризик короткострокової летальності після операції (до 1%). Цей варіант використовується в тих випадках, коли іншим чином хворі не можуть підтримувати вагу свого тіла.

Якщо зміни способу життя пацієнтів з помірним ступенем діабету не призвели до покращення протягом шести тижнів, то застосовується фармакологічна терапія. При важких ступенях ЦД 2 типу фармакологічні препарати є основою терапії. Невід'ємною складовою лікування є і терапія набутих ускладнень.

Зараз застосовують чотири основні групи протидіабетичних засобів – бігуаніди (знижують гліюконеогенез у печінці й інсулінорезистентність мязової та жирової тканин, метформін), стимулятори секреції інсуліну (препарати сульфанілсечовини, меглітиніди, що стимулюють процеси в підшлунковій), інсулінові сенсibilізатори (покращують чутливість периферичних тканин до інсуліну, тіазолідиндіони), інгібітори α -глікозидази (знижують всмоктування глюкози в кишківнику). Окремо можна сказати про інсулін та його аналоги (гларгін та детемір), які є джерелами екзогенного рекомбінантного інсуліну. Під час інсулінотерапії необхідно регулярно

моніторити рівень глюкози в крові для розуміння остаточного ефективного дозування. Більшість хворих на ЦД 2 типу не потребують гормону або його аналогів на перших стадіях хвороби. Зазвичай його приймають на ніч (рідше – двічі на день), паралельно з іншими протидіабетичними пероральними засобами.

Метформін зазвичай рекомендують як першочергову терапію, оскільки існують докази, що він зменшує смертність [19]. Препарат має певні протипоказання (ниркова й печінкова недостатність) й може індивідуально не підходити пацієнту або групі пацієнтів (наприклад, має низьку ефективність й багато побічних впливів при терапії дитячого ЦД 2 типу) [10]. Згідно з *Кауа et al.* метформін відіграє захисну роль при ендотеліальній дисфункції та може бути корисним для лікування еректильних розладів у пацієнтів з інсулінорезистентністю [20]. Також можлива комплексна терапія – другий пероральний засіб іншої групи застосовують, якщо одного метформіну недостатньо. Інші лікарські засоби виявилися неефективними при монотерапевтичному підході для забезпечення задовільного контролю рівня глюкози в крові, тому терапевтичний ефект досягається шляхом комбінованої терапії. Основні недоліки такого лікування пов'язані з поліфармакологічним впливом – кілька побічних ефектів, токсичність і небажана взаємодія між ліками. Зважаючи на недосконалість існуючих ліків постійно йде пошук нових. Наприклад, застосовують агоністи рецепторів глюкагоноподібного пептиду-1 (GLP-1), що уповільнюють травлення та знижують рівень глюкози в крові, інгібітори дипептидилпептидази-4, які теж сприяють зниженню рівня глюкози в крові, та інгібітори котранспортера-2 натрію-глюкози (SGLT2), що запобігають реабсорбції глюкози в кров. Докази, отримані на тваринних моделях, свідчать про те, що DPP4і може покращувати еректильну функцію у пацієнтів із цукровим діабетом 2 типу, сприяючи відновленню судин і ендотелію та покращуючи дію вазорелаксантів, опосередкованих фактором росту ендотелію судин [20]. Дія глюкозозалежного інсулінотропного поліпептидного гормону (GIP) і глюкагоноподібного пептиду 1 (GLP-1)

лежать в основі терапії на основі інкретинів – що діють як важливі регулятори постпрандіального глікемічного контролю (включаючи стимуляцію секреції інсуліну та експресії генів інсуліну, сприяння виживанню β -клітин, покращення чутливості β -клітин до глюкози та зниження секреції глюкагону). Є дані про потенційне клінічне використання адипонектину та гепатокінового фактора росту фібробластів (FGF) [21, 22]. Нещодавно було підкреслено, що епігенетична регуляція диференціації β -клітин підшлункової залози залучена в розвиток секреторних порушень. Наразі відомо про кілька біоактивних молекул, які широко поширені в рослинах та відіграють ключову роль у модифікації гістонів і метилюванні ДНК, що робить їх новими потенційними лікувальними засобами. Дослідники зробили висновки, що хоча і були отримані деякі суперечливі результати, біологічно активні молекули з епігенетичною регуляторною функцією є потенційною заміною/додатковою терапією до фармакологічних гіпоглікемічних препаратів з мінімальними побічними ефектами. Вони показали, що БАМ запобігають або сповільнюють розвиток ЦД 2 типу та супутніх станів, які пов'язані з дисфункцією кровоносних судин і нирок через тривалу гіперглікемію. Епіпрепарати – ще одна стратегія запобігання або відстрочення початку ЦД через епігенетичні механізми, а їх використання має високий потенціал, оскільки вони можуть генетично модулювати хвороби, тоді як інші методи лікування діють через інші біохімічні механізми. Було показано, що багато відомих рослин (наприклад, імбир, чай і пажитник) і фітохімічних речовин (наприклад, куркумін і ресвератрол) взаємодіють з різними білками-мішенями і корисні для терапевтичного додаткового використання разом з фармакологічними гіпоглікемічними препаратами. Механізми, пов'язані з терапевтичними ефектами потенційних препаратів полягають у: зниженні резистентності до інсуліну через інгібування 11β -HSD, посиленні активності інсуліну через інгібування PTP1B, регуляції рівня естрадіолу через інгібування 17β -HSD, надходженні глюкози в регуляцію біосинтезу гексозаміну через інгібування

GFAT і встановлені ролі SIRT6 у секреції інсуліну, поглинанні глюкози та регуляції гліюконеогенезу [23].

Щоб покращити ефективність наявної терапії можна вдатись до регулювання способів, доз та часу введення. Так, було проаналізовано вплив циркадних ритмів – на клітинному рівні гепатоцити демонструють чіткі циркадні коливання в транскрипції, трансляції та морфологічних характеристиках, таких як розмір і об'єм клітин. Зокрема, гепатоцити демонструють циркадні моделі експресії метаболічних генів, необхідних для регуляції поглинання та зберігання глюкози в печінці (наприклад, *Glut2* і *Gck*), виробництва глюкози в печінці (наприклад, *Pepck* і *Gcgr*), а також клітинних процесів, залучених до окислення та зберігання ліпідів у печінці. Це свідчить про те, що терапевтичні стратегії, розроблені для покращення функції циркадного годинника, можуть бути корисними для профілактики та лікування метаболічних розладів, таких як ЦД 2 типу. Додавання мелатоніну гризунам довело свою ефективність у зниженні ожиріння та ослабленні інсулінорезистентності як печінкових, так і скелетних м'язів (шляхом прямого посилення каскаду сигналів клітинного інсуліну), а ще було показано, що в ізольованих острівцях ЦД 2 типу активація передачі сигналів мелатоніну послаблює індукцію окислювального та ендоплазматичного стресу ретикулуму та покращує стимульовану глюкозою секрецію інсуліну та виживання β -клітин [24].

Оскільки діабет має багатофакторну патологічну природу, одночасна взаємодія більш ніж одного потенційного модулятора є перспективною розробкою для нових методів лікування. Ще одним важливим напрямком, що допоможе розширити інструментарій ефективних ліків, необхідних для оптимізації лікування ЦД 2 типу, є розробка персоналізованих підходів до терапії. Але включення фармакогенетичної інформації в клінічну практику в контексті персоналізованої медицини може відбутися лише після отримання більшої кількості результатів досліджень, які підтвердять значну взаємодію між генами та ліками. Пристосування медичної терапії до біологічних

особливостей пацієнта допоможе оптимізувати лікування, тим самим покращуючи загальний прогноз і знижуючи ризик супутніх захворювань.

Діабет-асоційована ЕД може потребувати окремої терапевтичної програми. Першою ланкою терапії ЕД є інгібітори фосфодіестерази 5 (PDE5) — тобто медикаментозна стимуляція утворення оксиду азоту у вистилці судин. До них відносять силденафіл, тадалафіл, варденафіл, аванафіл. Певні терапевтичні ефекти матимуть і протидіабетичні препарати.

Відомо, що метформін відіграє захисну роль при ендотеліальній дисфункції та може бути корисним для лікування ЕД у пацієнтів з інсулінорезистентністю. Кілька досліджень на тваринах і людях підкреслили й нейромодуючий ефект метформіну. Ці дослідження, які зосереджувалися на впливі на параметри АТ і частоти серцевих скорочень, показали, що метформін може послабити надмірну активність симпатичних нервів і корисний для покращення еректильної функції. Утворення бляшок в артеріях статевого члена погіршують кровотік і сприяють ЕД. Було припущено, що метформін має позитивний вплив на зниження АТ і наслідкової ЕД. Незважаючи на те, що цей ефект був продемонстрований на моделях тварин, чіткого консенсусу в клінічних випробуваннях на людях ще не досягнуто, але вже можна припустити, що особливу увагу на цей препарат слід звернути у разі слабкої відповіді пацієнта на лікування інгібіторами PDE5 [25, 26].

Лікування інсуліном покращує еректильну функцію у щурів, що мають діабет 2 типу – у тих тварин, які отримували інсулін, спостерігався вищий внутрішньокавернозний тиск, ніж у контрольній групі, а також знижені рівні проапоптичних факторів і підвищені рівні антиапоптичних факторів. Подібні результати отримали й в інших дослідженнях. Взагалі, уже відносно давно показано на тваринних моделях, що лікування інсуліном може відновити еректильну функцію шляхом модуляції гена рецептора статевого гормону та експресії білка, підвищуючи рівні експресії мРНК та білка рецептора андрогену та рецептора естрогену-альфа [25]. При тривалому прийомі схожі ефекти чинитиме і дулаглутид [27]. Але не все протидіабетичне лікування

сприятиме зменшенню проявів ЕД. Так, вона може бути викликана такими препаратами, як β -блокатори та тiazиди, які часто використовуються для лікування діабету та психологічних станів, включаючи депресію [28]. Саме тому продовжуються пошуки дієвого лікування, яке впливатиме саме на патофізіологію ЕД.

1.4. Клітинна терапія – альтернативний метод лікування ускладнень цукрового діабету

Клітинна терапія – це один з методів, що почали застосовувати відносно недавно. В разі успішної інтеграції клітин в тканину реципієнта позитивний ефект спостерігається протягом багатьох місяців або років; до того ж використання стовбурових клітин робить можливим відновлення природної структури і функцій того чи іншого органу, тканини, втрачених в результаті хвороби або травми. Отримані клінічні та доклінічні дані вказують на високий терапевтичний потенціал – терапія стовбуровими клітинами може бути альтернативним інструментом для пацієнтів з діабетом для покращення регенерації β -клітин і периферичної ішемії [29]. Позитивні ефекти від клітинної терапії зберігаються протягом тривалого терміну й полягають в: відновленні чутливості периферичних тканин до інсуліну (зниженні інсулінорезистентності); нормалізації рівня глюкози в крові; зниженні ендогенного синтезу глюкози в печінці; нормалізації ліпідного обміну; поліпшенні мікроциркуляції в усіх органах; захисті судинних стінок; зниженні вмісту HbA1c (глікозильованого гемоглобіну); зменшенні ризику виникнення ускладнень діабету і їх проявів, якщо вони є. Після клітинної терапії пацієнти очікувано можуть контролювати рівень глюкози меншою кількістю препаратів або тільки за допомогою дієти, вести більш активний спосіб життя. Відмічається нормалізація гормонального та імунного статусу, покращується

якість життя та його тривалість. Координаційний центр трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України разом з Інститутом клітинної терапії провели клінічне дослідження серед хворих на ЦД 2 типу. Протягом 3 місяців після трансплантації МСК було зафіксовано зниження практично до нормальних значень рівня глюкози і глікозильованого гемоглобіну. У пацієнтів нормалізувалися показники жирового обміну, знизився індекс атерогенності, покращилися біохімічні показники функції печінки. Іншим напрямком клітинного введення є отримання β -подібних клітин із hPSC, проте складність їх конструювання поки гальмує можливість їх використання. Існує декілька видів стовбурових клітин, які різним чином зарекомендували себе в клітинній терапії. Вибір оптимального різновиду допоможе уникнути можливих негативних наслідків від такого методу лікування і розкриє весь їх регенеративний потенціал з урахуванням специфіки органу-мішені.

На перший погляд ембріональні стовбурові клітини здаються ідеальним варіантом – вони здатні до майже необмеженої проліферації і диференціювання в усі типи клітин. Однак ці процеси після трансплантації в організм реципієнта неможливо контролювати. Тому, трансплантовані у дорослий організм, вони можуть утворювати тератоми і тератокарциноми (доброякісні та злоякісні пухлини, що складаються з похідних трьох зародкових листків). Можливе і відторгнення трансплантата.

Можна використовувати фетальні стовбурові клітини, тобто виділені з абортіваних плодів. Вони не представляють небезпеки канцерогенезу, але їх важко отримувати в достатній для трансплантації кількості. До того ж - є ризик їх імунного відторгнення.

Увагу дослідників привертають і дорослі стовбурові клітини, які можна виявити в жировій тканині, шкірі, нирках, кров'яному руслі, головному і кістковому мозку. Ці клітин здатні давати початок тільки елементам тієї тканини, з якої походять і їх кількість досить невелика - вони слугують скоріше для фізіологічної регенерації. Зараз розроблені методи впливу на такі

клітини різними факторами росту, що дозволяють контролювати напрямок їх диференціації і направляти у потрібну сторону.

Найдоступнішими для вирощування в культурі і подальшого використання є мезенхімальні стовбурові клітини. Методики роботи з ними добре відпрацьовані, а самі клітини використовують для експериментального лікування багатьох хвороб. Також клітинна терапія може використовуватись в комплексі з фармакологічною.

При лікуванні такого частого наслідку, як еректильні проблеми, саме клітинна терапія – той ідеальний варіант, щоб не тільки усунути проблеми з ерекцією, а й повпливати на розвиток ЦД 2 типу. Її вже активно використовують при ішемічних станах, відмічаючи позитивний вплив на васкуляризацію тканин [29].

Більшість наявних доклінічних досліджень проводились на щурах і вказали на однозначну потребу в подальшому вивченні й застосуванні даного методу. Наприклад, встановлено, що регенеративний ефект стовбурових клітин може бути досягнутий їхньою паракринною дією та їхньою здатністю диференціюватися в багато ліній клітин, включаючи ендотеліальні та гладком'язові клітини. Показано, що ефективними можуть бути і трансплантації клітинних продуктів – лізатів та виділених екзосом. Chen та інші зікавилися впливом клітин та ADSC-похідних екзосом на покращення еректильної функції у тварин з моделлю ЦД. Дослідні тварини отримували інтракавернозні ін'єкції ADSC або екзосом. В обох випадках введені препарати призвели до збільшення співвідношення внутрішньокавернозного тиску до середнього артеріального тиску, а гістологічний і вестерн-блот аналізи продемонстрували: збільшення співвідношення гладкої мускулатури до колагену; підвищення експресії ендотеліального маркера (CD31), маркера гладкої мускулатури (α -актин гладкої мускулатури) і антиапоптозного білка Bcl-2; зниження апоптозу ендотеліальних і гладком'язових клітин у тканині кавернозного тіла [4]. Екзосоми, отримані з мезенхімальних стовбурових клітин, покращують метаболізм глюкози та ліпідів у печінці шляхом

посилення аутофагії, чим позитивно впливають на перебіг ЦД 2 типу [30]. Це вказує на можливість застосування їх введень не тільки для усунення ускладнень, а й для впливу на основне захворювання.

Інша група дослідників сфокусувалася на порівнянні ефектів від введення клітин та їх лізату. Трансплантація проводилася шляхом інтракавернозних ін'єкцій й призвела до відновлення кавернозних тіл, ультраструктури вистилаючого ендотелію, співвідношення колаген/гладка мускулатура. Найпомітнішими зміни були на гістологічному та імуногістохімічному рівнях оцінки. Щодо порівняння безпосередньої клітинної трансплантації з введення клітинного лізату, то обидва препарати змогли відновити структуру, ультраструктуру та покращити копулятивні функції в моделях щурів. Однак використання лізату виявилось безпечнішим та ефективнішим, бо клітини демонстрували значне зниження виживаності з часом [31]. Класична клітинна трансплантація теж використовується в обраних дослідженнях. Стовбурові клітини з високим потенціалом диференціювання, мезенхімальні стовбурові клітини пуповини людини (HUCMSC) широко використовувалися в лікуванні захворювань інших систем і, як очікується, будуть багатообіцяючою стратегією лікування діабетосоціюваної ЕД. В доклінічному дослідженні Feng вказано, що HUCMSCs можуть ефективно та безпечно полегшити еректильну дисфункцію у щурів з ЕД, одночасно відновлюючи еректильну функцію шляхом послаблення індукованого діабетом фероптозу в гладком'язових клітинах кавернозних тіл. Дослідники використовували два різних методи введення – і в судину, і в кавернозні тіла пеніса [32]. З огляду на застосування стовбурових клітин пуповини в клітинній трансплантації й обґрунтовані доклінічні дослідження, вже можливо проводити експериментальні втручання пацієнтам – сім хворих на ЦД 2 типу (які не досягали ерекції протягом принаймні 6 місяців, незважаючи на ліки, і очікували на протезування) продемонстрували відновлення ранкової ерекції (у 3 учасників ця можливість зберігалася більше 6 місяців після введення) та підвищення жорсткості (але вона була недостатньою для проникнення). Після додавання інгібітора PDE5

перед статевим актом 2 учасника досягли проникнення та відчули оргазм (ця можливість зберігалася більше 6 місяців після введення). 6 учасників повідомили про підвищений сексуальний потяг. В ході дослідження 2 пацієнта все ж зробили протезування, 4 – знову мали проблеми з ерекцією через 9 місяців після введення, а 1 заявив про повторні симптоми ЕД через 11 місяців після введення клітин. Щодо загального стану, то рівень глюкози в крові знизився на 2 тижні після введення, а дози протидіабетичних ліків були знижені в 6 суб'єктів на термін 4–7 місяців. Отже, терапія стовбуровими клітинами пуповинної крові людини позитивно впливає на зниження симптомів еректильної дисфункції та ЦД – стовбурові клітини та гуморальні фактори стовбурових клітин пуповинної крові людини сприяють цим позитивним ефектам [3].

Вищенаведені дані вказують на однозначну потребу в пошуку нових методик лікування ЦД 2 типу й пов'язаних ускладнень. Клітинна терапія може стати ефективною, малоінвазивною терапевтичною стратегією, яка відрізнятиметься підвищеним рівнем персоналізації та відсутнім фармакотоксичним впливом. Також до її переваг можна віднести одночасний позитивний вплив на різні органи-мішені, що є важливим при лікуванні ендокринного захворювання, яке супроводжується численними ускладненнями. На сьогодні, ще не всі механізми впливу клітин зрозумілі дослідникам. Перспективною є галузь досліджень впливу речовин, що виділяються стовбуровими клітинами, для лікування патологій. Високий терапевтичний вплив більшості з них вже доведено, потрібно лише глибше дослідити його. Окрема ніша – комбінування клітинної терапії з іншими терапевтичними методами і міждисциплінарний підхід до вирішення цієї проблеми (з залученням новітніх надбань інших галузей науки та медицини).

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Етико-правові норми проведення експерименту

Усі маніпуляції з пацієнтами, їх біологічним матеріалом виконувались згідно з дотриманням міжнародних правил належної клінічної практики. Дані, зібрані під час дослідження, оброблялися в конфіденційний спосіб. Донація пуповинного матеріалу здійснювалась на засадах добровільної інформованої згоди. Тести по перевірці донора на інфікованість (сифіліс, віруси імунодефіциту людини, цитомегаловірусу та вірусу гепатитів В і С, TORCH інфекції, стерильність) відповідають положенням наказу Міністерства охорони здоров'я України від 10.06.2004 року №294. Готовий клітинний продукт контролювали за методикою “Контроль стерильності консервованої крові, її компонентів, препаратів, консервованого кісткового мозку, плазмозамінюючих та консервуючих розчинів, умов їх заготівлі” затвердженої наказом МОЗ України № 164 від 05.07.99.

2.2. Вибір учасників дослідження

В дослідженні приймало участь 13 пацієнтів. Це були чоловіки наступних вікових категорій: 25 років (1), 35-45 (1), 45-55 (6), 55-65 (4), 65+(1). Середній вік складав 51 рік. 69% опитаних чоловіків були одруженими, 15% – ні, більше 14% були розлученими або вдівцями. Неодружені чоловіки не мали постійних сексуальних партнерів й вказували на важкість їх пошуку через наявні проблеми з ерекцією. Більшість одружених чоловіків (7 з 9) відчували значний психологічний дискомфорт в стосунках через відсутність бажаного рівня сексуальної активності.

Кожному суб'єктові дослідження привласнили порядковий номер, який внесли до індивідуальної реєстраційної картки (містить паспортні данні пацієнта, опис змін суб'єктивного та об'єктивного стану пацієнта та данні інструментальних досліджень на всіх контрольних етапах дослідження). Пацієнти підписували інформаційну згоду, чим підтверджували відсутність критеріїв виключення та достовірність наданої інформації. Їх було попереджено про можливість відмовитися від участі в дослідженні на будь-якому етапі без пояснення причини.

Основною вимогою до пацієнтів була наявність еректильної дисфункції, що виникла внаслідок ЦД II типу. Їх діагноз підтверджувався декількома незалежними спеціалістами на основі скарг, медичних оглядів, результатів профільних скринінгів (УЗД та біохімічні дослідження). Крім того, вони мали відповідати викладеним нижче вимогам.

Критерії невключення учасників дослідження у випробування: інфекційний або запальний процес в ділянці введення; наявність хронічних або гострих захворювань внутрішніх органів важкого ступеню тяжкості або в стані декомпенсації; гіперчутливість до допоміжних компонентів, що входять до складу ін'єкційного імпланту; гіперчутливість до знеболюючих засобів; відмова учасника або підозра на неспроможність учасником дотримуватись вимог протоколу; активне онкологічне захворювання протягом останніх 5 років; порушення зсідання крові; позитивний результат на ВІЛ, вірус гепатиту, сифіліс чи інші інфекційні захворювання; алкоголізм, зловживання наркотиками чи психічні розлади протягом 3 років до початку випробування; участь у будь-якому іншому клінічному випробуванні за 3 місяці до початку данного випробування.

Критерії вибування учасників дослідження: відмова пацієнта від подальшої участі у клінічному випробуванні; виникнення в ході дослідження важких і/або несподіваних побічних реакцій. У разі передчасного вибування пацієнта з дослідження, заміна пацієнта новим не проводилась. Дані, отримані у вибулого пацієнта використовувались при аналізі результатів клінічного

дослідження. Причини передчасного виходу пацієнта з дослідження вказували в індивідуальній реєстраційній формі.

Відібрані учасники були розділені за наступними групами – пацієнти з органічною ЕД, пацієнти з психогенною ЕД та пацієнти зі змішаною ЕД (рис. 2.1). Органічна форма порушення ерекції, викликається певними порушеннями в організмі: ендокринними, судинними, неврологічними. Вона характеризується важкими чи помірними змінами в тканинах пеніса, судинах та нервах тазової ділянки. Характерні ознаки – поступовий початок, рідко бувають нічні або спонтанні ерекції, лібідо трохи знижене або нормальне, проблеми виникають незалежно від зовнішніх обставин. При ЦД II типу часто спостерігаються наступні випадки: досягнення ерекції затруднене, повільне, важке, часто ерекція неповна, статевий член млявий (при недостатньому артеріальному притоці або надмірному венозному скиданні крові), або ж збудження статевого члена настає швидко, ерекція досить хороша, але швидко зникає, не дозволяючи завершити, а іноді й почати статевий акт (при недостатньому венозному блоці).

Психогенна еректильна дисфункція обумовлена психоемоціональними особливостями людини, може бути короткостроковою або ж затягуватись у часі й призводити до появи невідворотних змін в тканинній структурі статевих органів. В літературі вказується на зв'язок між вищим ризиком виникнення важких депресивних станів в чоловіків з проблемами сексуального характеру [33]. Одночасно, частим наслідком психологічних хвороб є падіння лібідо, нездатність до сексуального збудження та ерекції. Характерними діагностичними ознаками є: раптовий початок (часто буває при першому статевому акті, при зміні сексуальної партнерки), наявність нічних спонтанних ерекцій (наприклад, при перегляді еротичних фото), "ситуативне" порушення ерекції (коли проблеми виникають при певних обставинах), прискорена еякуляція. Після невдалого статевого акту чоловіка турбують думки про власну неповноцінність, гнітить страх повторення невдачі, поступово формується синдром тривожного очікування невдачі.

Часто порушення ерекції, викликані органічними причинами, поглиблюються психологічним компонентом, який після усунення першопричини може збережигатися. В таких випадках варто говорити про змішану форму ЕД. Депресія, тривалий стрес, загальна хронічна втома, погане самопочуття, конфлікти, невідповідність сексуальних звичок і переваг, страх перед можливою вагітністю або зараженням венеричним захворюванням теж можуть провокувати фізіологічні зміни в організмі.

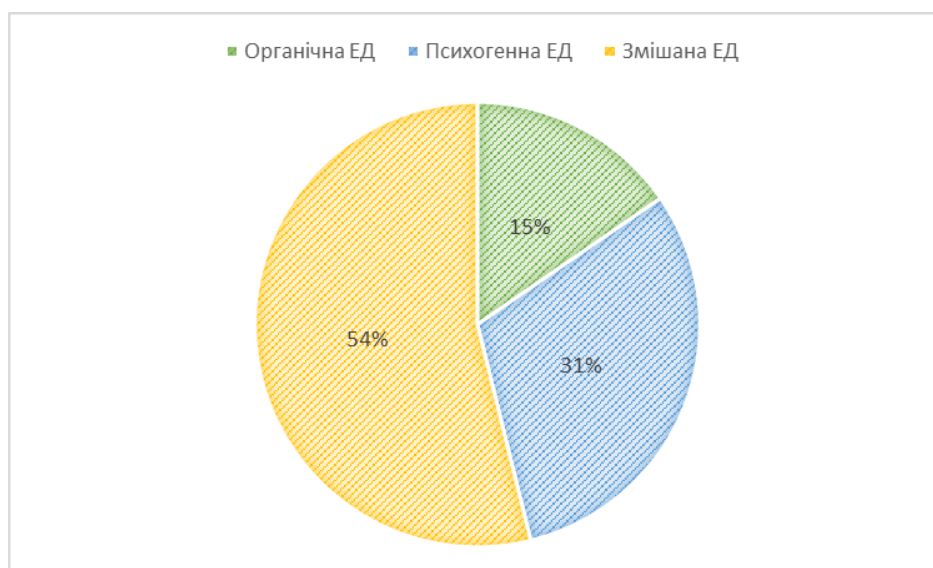


Рис. 2.1 Розподіл учасників дослідження за групами відносно етіології ЕД.

Крім того, для подальшого аналізу важливо знати про супутні хвороби учасників. Ці дані наведено в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Супутні діагностовані в учасників хвороби

Орган/система органів	Кількість учасників	Відсоток від загальної кількості
Серцево-судинна	3	23,1%
Ендокринна	13	100%
Гепатобіліарна	1	7,7%
Нервова	1	7,7%
Репродуктивна	4	30,8%

Нами не було помічено кореляції між групою ЕД та супутніми хворобами певних органів/систем органів. Для оцінки впливу шкідливих звичок на протікання ЕД пацієнти надали дані про своє відношення до цигарок/алкоголю (табл. 2.2).

Таблиця 2.2

Поширеність тютюнопаління та вживання алкоголю серед учасників

Статус	Кількість учасників	Відсоток від загальної кількості
Вживають алкоголь дуже рідко	8	61,5%
Не вживають алкоголь	4	30,8%
Помірно вживають алкоголь	1	7,7%
Регулярно палять	5	38,5%
Не палять взагалі	7	53,8%
Іноді палять	1	7,7%

2.3. Оцінка якості клітинного продукту

Для можливості використання з метою введення пацієнтам, клітинний препарат має контролюватись згідно законодавчих норм на усіх етапах виготовлення. Так, забір матеріалу пуповинно-плацентарного комплексу проводився лікарем в пологовому будинку, після чого відібраний донорський матеріал в розчині Хенкса з додаванням антибіотику та необхідні документи доставили в лабораторію. Робота з виділення та подальшого культивування проводилась в стерильних умовах ламінарного боксу біологічної безпеки II класу. Первинна культура клітин виділялась на середовищі Alpha MEM (BioWest) з додаванням антибіотику методом прикріплених експлантів. При досяганні субконфлюенту експланти відкріпили та утилізували. Наступне культивування відбувалось з використанням середовища без вмісту антибіотиків. Концентрацію клітин визначали на автоматичному лічильнику

клітин Luna по інструкції. Життєздатність визначали методом вітального фарбування барвником трипановим синім. В ході кожного пасажу певна надлишкова кількість клітин кріоконсервувалась. Дана процедура виконувалась за допомогою контейнера Mr. Frosty (Thermo Scientific) – вміщує до 18 вайлів, які охолоджуються зі швидкістю близькою до $-1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, що є оптимальним значенням для збереження високої виживаності клітин. Після заморожування зразки зберігались в рідкому азоті за температури -196°C .

Морфологічний профіль клітин контролювався за допомогою світлової мікроскопії. Також для морфологічного опису клітин та їх проліферативного потенціалу було використано фарбування барвником Hoechst 33342 з подальшим аналізом на флуоресцентному мікроскопі Leica Led 2000 (10x, об 20x).

Для встановлення диференційного потенціалу процес культивування проходив на спеціальних середовищах. Після чого отримані клітини аналізувались за допомогою проточного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter). Так, до отриманого матеріалу додавали відповідні антитіла, інкубували в темряві, вносили по 2мл Stain Buffer BSA (BD Pharmingen) й центрифугували протягом 5 хв при 1000об/хв 2 рази (для відмивки антитіл). Результати обробляли на ліцензійній програмі для проточного цитометра CytExpert. За допомогою цієї методики встановили й фенотиповий вміст продукту – за правилами, кількість клітин, що несуть маркери мезенхімальних стовбурових клітин, має бути 95% та вище.

Всі зразки вироблених препаратів на різних етапах підлягали суворому контролю відсутності контамінації – за відсутності росту мікроорганізмів у поживних середовищах вважалось, що зразки відповідають вимогам стерильності. Наявність росту мікроорганізмів у поживних середовищах можна оцінити візуально макроскопічно (каламуть, плівка, осад, включення), мікроскопічно та за допомогою біоаналізаторів. На етапі культивування аналізувалось середовище, а перед безпосереднім виготовленням препарату – вміст одного з вайлів партії. На спеціальний картридж аналізатора Endosafe

Nexgen PTS наносили зразок й отримували результат (вважався стерильним при значенні вмісту ендотоксинів менше 0,05 EU/ml). Препарат контролювався на наявність сифілісу, ВІЛ-1 та ВІЛ-2, гепатитів В та С за допомогою імунохроматографічних комбінованих діагностичних тестів в лабораторії. Також суспензію клітин об'ємом 2 мл передавали на бактеріологічний контроль в ТОВ «ТД «Омега Київ», а 1 мл – в лабораторію молекулярної діагностики для визначення забруднення інфекційними агентами методом полімеразної ланцюгової реакції на наявність вірусних та паразитарних інфекцій.

2.4. Схема введення клітинного препарату

Від обраної методики введення залежить, скільки клітин потраплять в осередок ураження, рівень їх виживання, побічний вплив на інші системи організму. Ін'єкційне введення клітин можна проводити в судини (інтравенозно, інтраартеріально) або ж локально. Місцеве введення дозволяє сконцентрувати більше клітин саме у місці ін'єкції, в той час як внутрішньосудинне – охопити більше потенційних органів-мішеней. Кожен метод має свої недоліки. Так, при внутрішньовенному – це ризик інфікування пацієнта, гематоми та подразнення в місці уколу, швидке надходження клітин в кровоток, неможливість контролю їх кінцевої локалізації. Можуть виникати септичні реакції, флебіти та тромбофлебіти. Основними побічними реакціями локального введення можуть стати набряк в місці ін'єкції, гематоми, фіброз запалих тіл, інфекції, викривлення (фіброзні вузлики в печеристих тілах можуть це спровокувати) пенісу; також існує ризик пріапізму – тривалої болючої ерекції, що не супроводжується статевим збудженням та бажанням [3].

Наша робота націлена на оцінку впливу клітинної терапії на відновлення саме еректильної здатності, тому було обрано місцеві інтракавернозні ін'єкції. Процедура проводилась лікарем – голка під кутом 90 градусів різким рухом вводилася всередину печеристого тіла в районі основи пеніса на всю її довжину. Для забезпечення рівномірного розподілу продукту, ін'єкції проводили з обох боків статевого члена. Ін'єкція проводилась одноразово. Щоб клітини встигли хоч трохи імплантуватися після введення, лікар затискав перед уколом основу пеніса резинкою і знімав її через 15 хвилин після.

Спираючись на літературні дані, обрали оптимальну кількість клітин для досягнення помітного позитивного впливу – 50 млн алогенних МСК. Основою препарату був стерильний фізіологічний розчин, який не має в складі елементів, що провокують алергічні реакції. До того ж, фізіологічний розчин підтримує оптимальний стан МСК при їх транспортуванні з лабораторії до лікарні. Об'єм готового препарату, який надавався нами, дорівнював 3 мл і містився в стерильному одноразовому шприці.

2.5. Оцінка ефективності клітинної терапії

Для оцінки ефектів від введення клітинного препарату розглядали декілька методик. Наприклад, реофалографія, доплерометрія, фармакододплерометрія, селективна артеріографія, дуплексне УЗД, опитування за анкетами ММРІ або ПЕФ, вазоактивний тест (введення вазоактивних препаратів, таких як папаверин, фентоламін, простагландин Е, що викликають розширення кавернозних артерій і розслаблення гладкої мускулатури), психологічне дослідження (для визначення причин ЕД), біохімічний чи загальний аналіз крові, біохімічне визначення метаболітів оксиду азоту у кавернозній та периферичній крові, неврологічні дослідження (оцінка латентності бульбокавернозного рефлексу та нервової провідності), NTPR

(вимірювання нічного набрякання та ригідності статевого члена за допомогою спеціального приладу), DICC (динамічна інфузійна кавернозометрія/кавернозографія) тощо. Кожен з методів має свої обмеження й дозволяє оцінити ЕД лише за певними параметрами.

Так, УЗД методики націлені на оцінку стану судин мікроциркуляторного русла статевого члена – дуплексна ультрасонографія приклад найпростішого. Якщо результати дуплексної ультрасонографії нормальні (піковий систолічний кровоплин перевищує 30 см/сек., а індекс резистентності більший як 0,8), немає потреби продовжувати судинні тести. При незадовільних результатах (такі пацієнти є потенційними кандидатами для реконструктивних операцій) показані артеріографія та динамічна інфузійна кавернозометрія/кавернозографія. Саме УЗД може здаватись ідеальною формою контролю ефективності нашого препарату, але в літературі не було даних щодо можливого впливу вазоактивних препаратів, що використовуються в цих методиках, на трансплантовані стовбурові клітини. Okремо варто наголосити на підвищеному рівні стресу в пацієнтів під час даних процедур. Це може впливати на загальний стан перебігу ЕД й створювати значний психологічний тиск на учасників.

Біохімічні дослідження не дають цілісного уявлення про ситуацію і скоріше виступають допоміжним інструментом оцінки. Психологічні дослідження є валідними лише для тих, хто має ЕД психогенної етіології. Подібна ситуація й з неврологічними методиками аналізу.

Тому, для максимально можливої точної оцінки впливу клітинної трансплантації, обрали міжнародний опитувальник IIEF. Ця анкета, що складається з 15 запитань, є підтвердженим, багатовимірним, самостійним дослідженням, яке визнали корисним для клінічної оцінки еректильної дисфункції та результатів її лікування [34, 35]. Оцінка від 0 до 5 надається на кожне з 15 запитань, які розкривають 4 основні сфери чоловічої сексуальної функції: ерекція, оргазм, сексуальний потяг/бажання, задоволення від статевого акту.

2.6. Статистична обробка

Будь-яке дослідження обов'язково закінчується статистичною обробкою отриманих даних та їх критичним аналізом.

Результати для оцінки якості виготовленого клітинного препарату знімали на проточному цитометрі CytoFLEX S V4-B2-Y0-R3 (Beckman Coulter, Китай). Результати обробляли в ліцензійній програмі для проточного цитометра CytExpert (програмне забезпечення, яке керує роботою приладу, збором і аналізом даних). Окрім графіків, було отримано статистичні ряди даних та таблиці з розподілом клітиної популяції.

Статистичний аналіз результатів опитування ПЕФ проводився за допомогою t-критерія Стьюдента. Дані підпорядковані закону нормального розподілу – результати представлені у вигляді середнього арифметичного та помилки середнього ($M \pm m$). Різниця між досліджуваними показниками вважається достовірно вірогідною при значенні $p \leq 0,05$. Для статистичного аналізу отриманих результатів анкетування використовувалась програма Microsoft Office Excel (Microsoft Corporation, США).

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Виготовлення клітинного продукту

Уся робота з виділеним матеріалом проводилась в стерильних умовах ламінарного боксу біологічної безпеки II класу. Після утилізації експлантів нами спостерігалось як отримана моношарова культура поступово очищується від слабоадгезивних клітин. На 14-ту добу культивування клітини рівномірно росли по всій поверхні культурального пластику. Всі зразки контролювались на предмет відсутності контамінації (макроскопічно та мікроскопічно) – за відсутності росту мікроорганізмів у поживних середовищах вважалось, що зразки відповідають вимогам стерильності.

До 16 – 18 доби адгезивні клітини виділені з пупкового канатику сформували 80 – 90% конфлуентного моношару. В процесі субкультивування гетерогенність вихідної суспензії поступово знизилась і вже після 3 – 4 пасажів культура мезенхімальних стовбурових клітин була представлена популяцією переважно фібробластоподібних клітин (рис. 3.1).

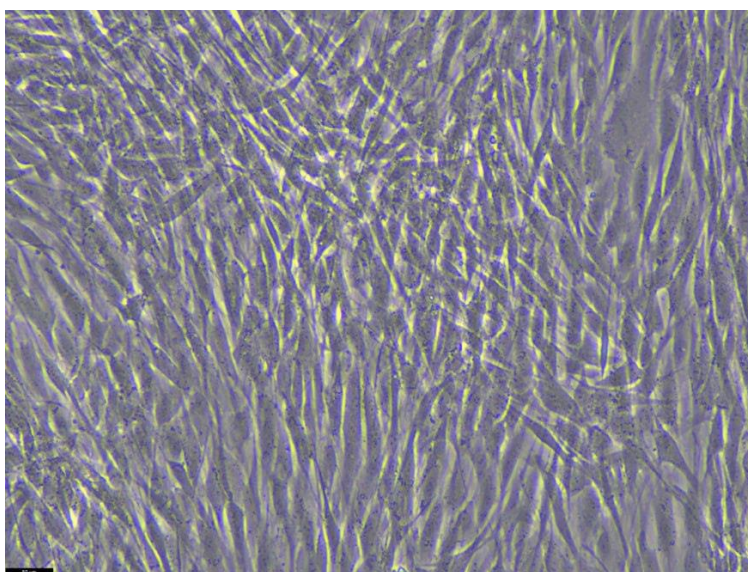


Рис. 3.1. Мікрофотографія загальної морфології МСК пуповини 4 пасажу (10x, об 20x)

Культивування проходило на пластикових флаконах, з площею росту 175 см². Для визначення концентрації клітин використовувався автоматичний лічильник Luna. Життєздатність визначалась методом вітального фарбування барвником трипановим синім й в середньому була вища 88%. Отримані результати були підтверджені і даними проточної цитометрії. В ході кожного пасажу кількість клітин збільшувалась в середньому в 2 рази, тому цей надлишок кріоконсервували в герметичних вайлах об'ємом 2 мл. В одному вайлі морозили не більше 10 мільйонів клітин – за нашими спостереженнями саме така кількість є оптимальною на даний об'єм кріопротектора й сприяє високій виживанності після розморожування. Накопичені клітини зберігались в дюарі з рідким азотом при температурі -196 °С.

Для культивування було обрано оптимальне за складом середовище Alpha MEM (BioWest), без додавання антибіотиків, сироватки та факторів росту – за фармакопейними правилами для внутрішньовенного введення [36]. Також в ході підготовки матеріалу для подальшого введення використовувались диференційні середовища. МСК є мультипотентними клітинами-попередниками, які володіють здатністю до самовідновлення (обмеженою *in vitro*) та потенціалом диференціювання в мезенхімальні лінії. Отже, отримання задовільних результатів диференціації вказує на високу якість клітин і правильний спосіб їх культивування. Отримані дані наведені у вигляді графіків (рис. 3.2).

CD10 і CD26 експресуються на суглобових хондроцитах людини, а декілька джерел вказують, що CD166 можна вважати маркером високої хондрогенності під час оцінки індукованих плюрипотентних стовбурових клітин [37]. 98% CD166+ та 96,8% CD10+ клітин вказують на високий рівень диференційного потенціалу (рис. 3.2 А1-2). Для визначення кількості остеобластів в популяції маркером було обрано лужну фосфатазу (одна з ізоформ прилипає до мембрани остеобластних клітин) й отриманий результат був задовільним – 95,5% (рис. 3.2 Б). Маркери жирової тканини CD34 і Ly-6 присутні в 97% популяції, що теж є задовільним (рис. 3.2 В1-2).

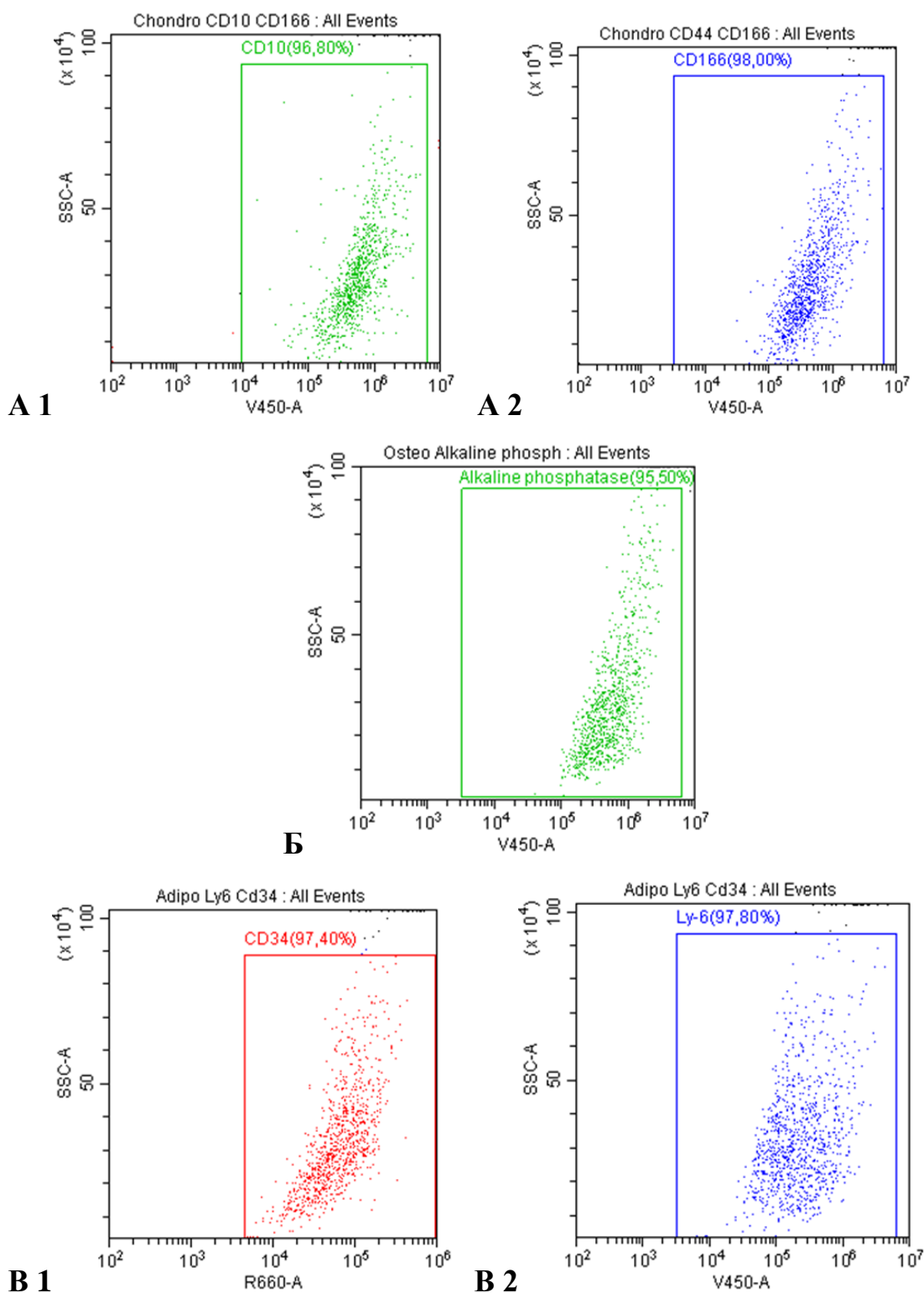


Рис. 3.2. Розподіл клітинної популяції: **А 1-2** – хондро диференційовані МСК; **Б** – остео диференційовані МСК; **В 1-2** – адипо диференційовані МСК.

В майбутньому для підтвердження отриманих результатів можна використати альтернативний метод – диференційні забарвлення. Так, в лабораторній практиці застосовують: алізариновий червоний для

ідентифікації кальцієвих відкладень кісткової тканини; толуїдиновий синій – для виявлення глікозаміногліканів та протеогліканів, що є в хондробластах; Oil Red O, за допомогою якого можна виявити ліпідні краплі. Дані методики можна використовувати паралельно з проточною цитометрією, для подвійної перевірки створюваного продукту.

Наступним етапом у виготовленні безпечного та ефективного клітинного трансплантату є аналіз його морфологічного вигляду, фенотипового вмісту та проліферативного потенціалу. Для якісної оцінки морфології було обрано фарбування за Hoechst 33342. Цей барвник зв'язується з малою борозенкою дволанцюгової ДНК, багаті на аденін і тинін послідовності значно посилюють флуоресценцію [38]. Хоча барвники Hoechst можуть зв'язуватися з ДНК у живих клітинах й не призводити до їх смерті, ми провели фарбування фіксованих препаратів. Крім того, за допомогою цього барвника можна виявляти зараження клітинних культур мікоплазмою, що є відносно поширеним явищем. Оскільки ці бактерії можуть суттєво змінювати клітинний метаболізм і потенційно поширюватися на всі клітинні культури в лабораторії, необхідно їх раннє виявлення, а одним із найшвидших і найдешевших методів є пряме фарбування ДНК мікоплазми барвниками DAPI або Hoechst. Принцип отримання зображення при флуоресцентній мікроскопії наступний – препарат опромінюють світлом з певною довжиною хвилі, воно поглинається флуорофорами (барвниками), змушуючи їх випромінювати світло з більшою довжиною хвилі (тобто іншого кольору). За допомогою фільтра спектрального випромінювання світло відокремлюється від слабшої випромінюваної флуоресценції.

На рис. 3.3А добре видно морфологію клітин, їх фібробластоподібну видовжену форму й яскраво забарвлені ядра. На рис. 3.3Б1-2 зображено проліферуючі клітини. На препараті ми змогли побачити багато клітин в стані мітотичних поділів, що свідчило про високий проліферативний потенціал культури.

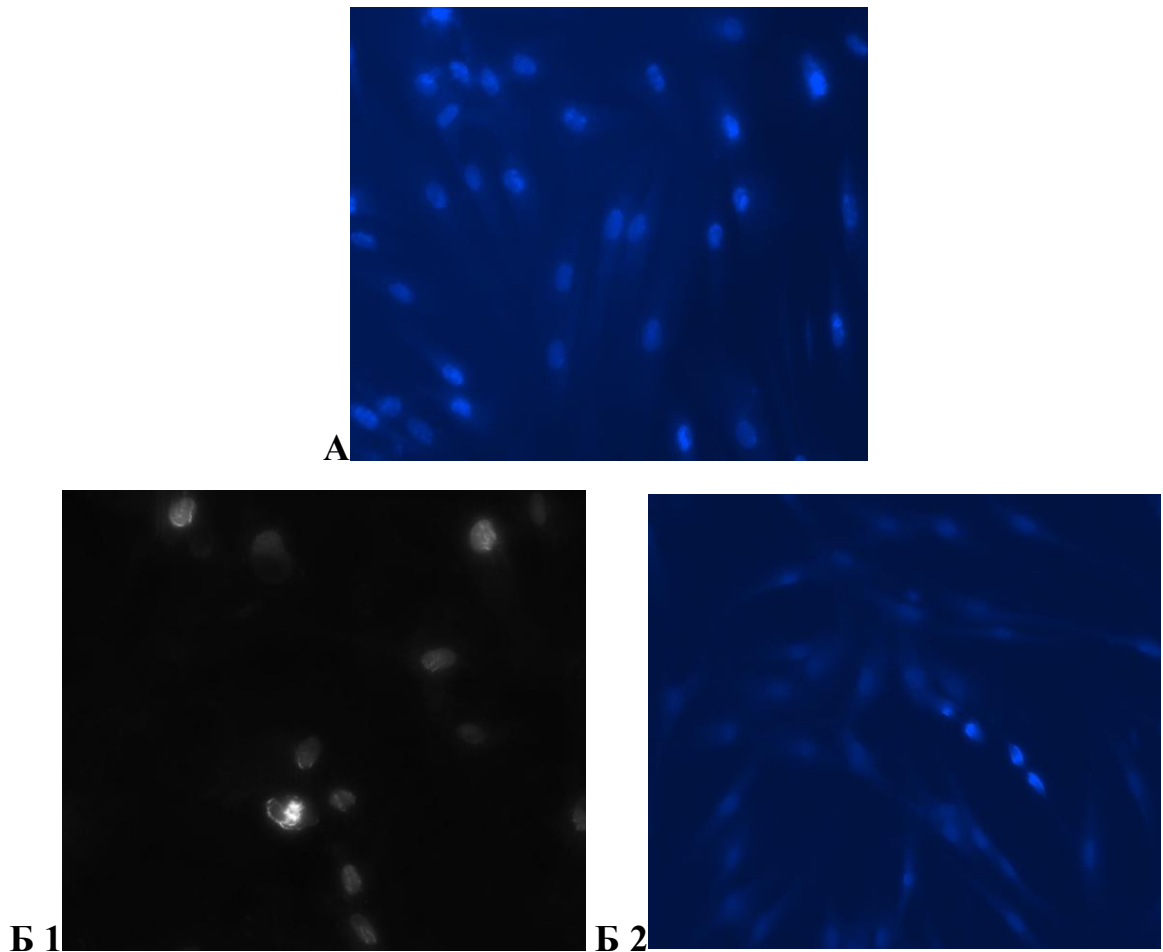


Рис. 3.3. Флуоресцентне зображення МСК пупкового канатику: **А** – загальний вигляд; **Б1-2** – ділянки проліферативної активності (10х, об 20х)

Якісний вміст – основний показник очікуваної ефективності й безпечності препарату, тому встановленню фенотипового профілю приділено багато уваги. Ідентифікація МСК в даний час базується на наявності поверхневих маркерів (Sca-1, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD90, CD73, CD105, серед інших, незважаючи на те, що жоден із них не є специфічним сам по собі) і на відсутності гемопоетичних (CD45, CD133, CD117) та ендотеліальних (CD31, CD10) антигенів. Проте експресія таких маркерів, як CD34, може регулюватися в умовах культивування *in vitro*. Патерни експресії поверхневих маркерів зазвичай визначаються проточною цитометрією для класифікації клітинного типу, але слід зазначити, що МСК неможливо виявити на основі експресії одного маркерного білка або послідовних однопараметричних вимірювань для визначення моделі експресії різних маркерів стовбурових

клітин. Комітет з мезенхімальних і тканинних стовбурових клітин Міжнародного товариства клітинної терапії запропонував три мінімальні критерії для визначення дієвих клітинних препаратів: МСК повинні бути пластичними при зберіганні в стандартних умовах культури; МСК повинні експресувати CD105, CD73 і CD90 і не експресувати антигенів, включаючи CD45, CD34, CD14 або CD11b, CD79alpha або CD19 і молекул HLA-DR; вони повинні диференціюватися в остеобласти, адипоцити та хондробласти *in vitro*. Наведені вище дані вказали на відповідність двом вимогам – клітини демонстрували стійку пластичну популяцію протягом 7 пасажів, диференціювались в остеобласти, адипоцити та хондробласти. Остаточне підтвердження достатньої якості для застосування виготовленого нами препарату в терапевтичних цілях отримано завдяки використанню проточної цитометрії (рис 3.4. та 3.5).

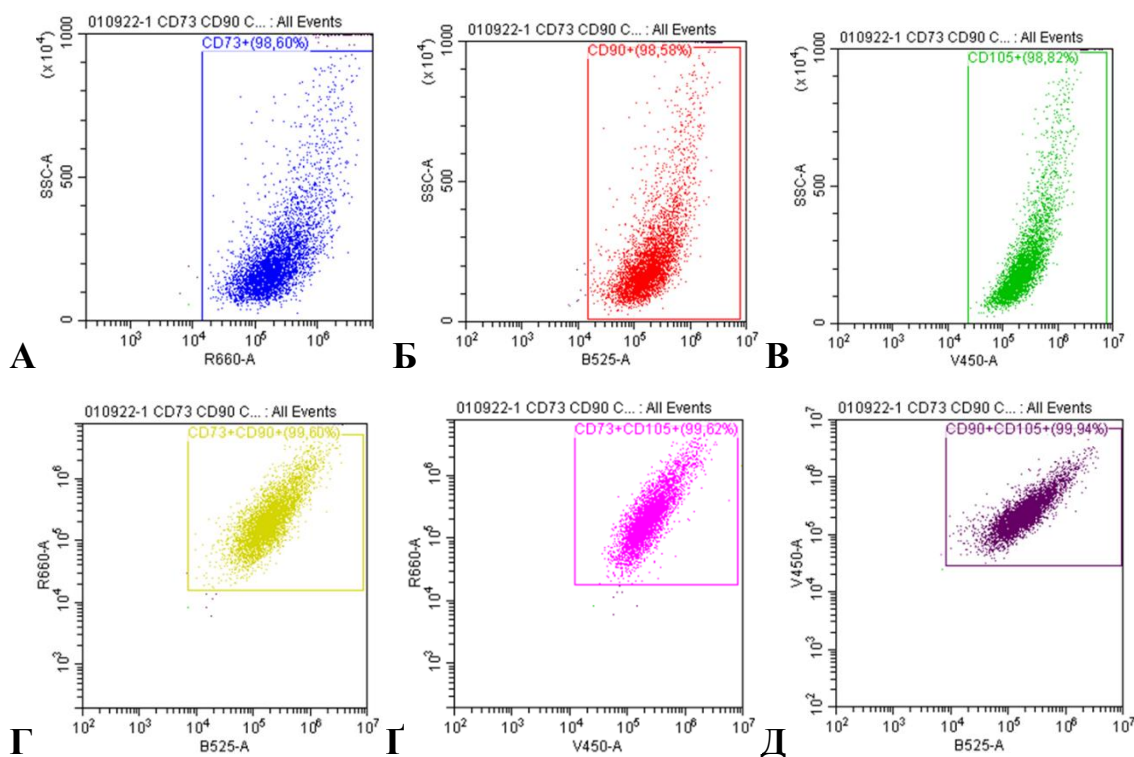


Рис. 3.4. Відсотковий вміст в популяції: А – клітин CD73+; Б – клітин CD90+; В – клітин CD105+; Г – клітин CD73+ та CD90+; Д – клітин CD73+ та CD105+; Е – клітин CD90+ та CD105+.

Отже, більше 98% досліджених клітин експресують маркери притаманні мезенхімальним стовбуровим клітинам. Три додаткових вимірювання також підтвердили, що більше 99% клітин подвійно позитивні за експресією CD73, CD90 та CD105.

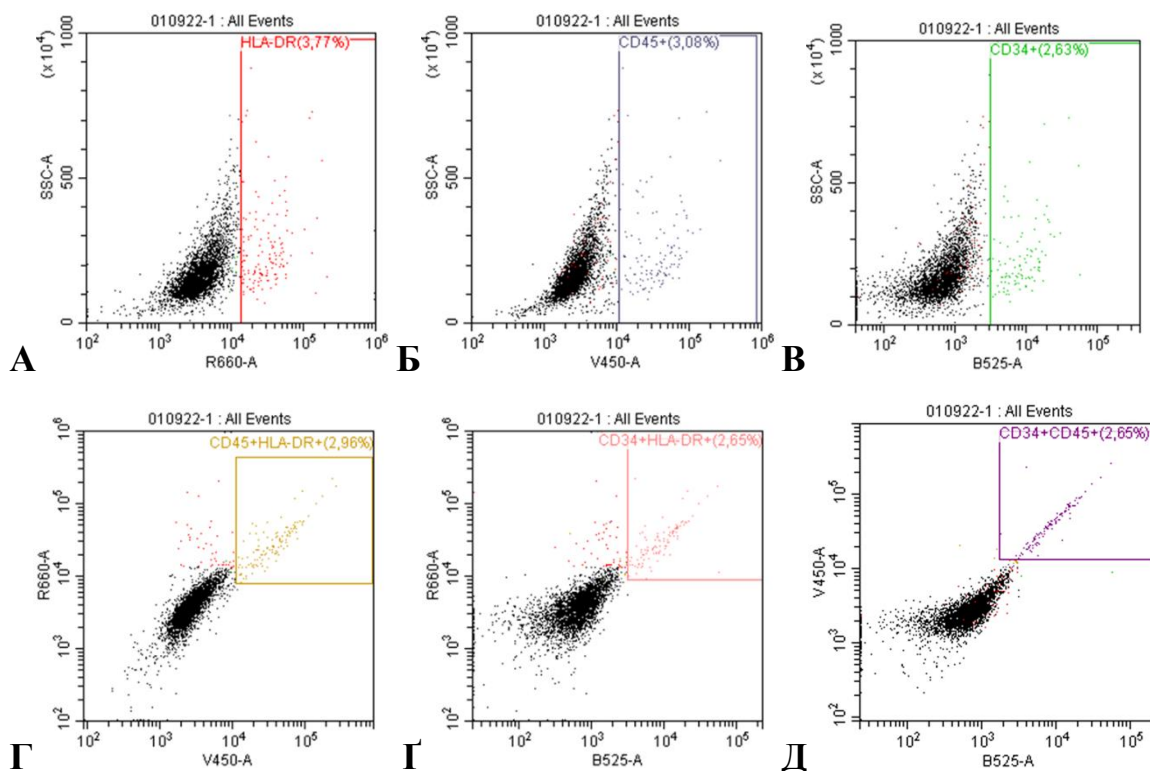


Рис. 3.5. Відсотковий вміст в популяції: А – клітин HLA-DR+; Б – клітин CD45+; В – клітин CD34+; Г – клітин CD45+ та HLA-DR+; Г – клітин CD34+ та HLA-DR+; Д – клітин CD34+ та CD45+.

Допустимими вважаються не більше 5% від загальної кількості досліджених клітин зразка. Спираючись на отримані графіки, середня кількість негативних за гемопоетичними маркерами клітин складає більше 97%. Так, найбільше клітин експресують HLA-DR – 3,7%. Клітин з маркерами CD34+ та CD45+ близько 2,5-3%. Такі результати повністю підтверджують МСК статус клітин зразка й вказують на можливість його застосування в терапевтичній практиці.

Крім особливих вимог до виготовленого нами препарату висунуті й стандартні – стерильність, відсутність вірусного або бактеріального забруднення. Контроль проводився макроскопічно (огляд вайлів на предмет

ушкоджень, постійний контроль на етапі культивування), мікроскопічно (вміст вайлів після розморожування, культуральні флакони) та за допомогою біоаналізатора Endosafe Nexgen PTS (одноразові тестові картриджі містять LAL, ендотоксин та синтетичний кольороутворюючий субстрат, після нанесення зразку можна кількісно визначити вміст ендотоксинівкінетичним хромогенним методом). Під час культивування було проаналізовано зразок культурального середовища, відібраний з флаконів. На екрані приладу в реальному часі слідкували за проходженням аналізу й не виявили ендотоксинів (вміст менше 0,05 EU/ml – найменше з можливих значень на даному аналізаторі). Протокол аналізу наведено нижче (рис. 3.6.). Та сама процедура була повторена зі зразком клітинної суспензії одного з вайлів, перед безпосередньою процедурою приготування клітинного препарату.

```

***** ENDOSAFE Test Record *****
          PTS150 V11.0.0
DateTime: ..... 24 Oct 2022 11:20:57
Device: ..... 22231211
Analyst: ..... 0LHA
Cartridge: ..... Endotoxin
Temperature: .. Start: 37.0C End: 37.0C
Method: ..... KX-122
Cartridge Lot#: ..... 2666140
Cartridge Cal Code: ..... 513936979277
Range: ..... 5-0.05
Range Time: ..... Sec: 139-769
Onset Time(s): ..... >769 248 >769 320
Slope: -0.371 ..... Intercept: +2.403
Dilution: ..... 1:1
Sample Lot: ..... 1
Sample Name: ..... 241022-1
Accessory #1: ..... 1
Accessory Lot #1: ..... 2666140
Accessory Exp. Date: ..... 16 Jun 2024
Sample Rxn Time CV: ..... 0.0% Pass
Spike Value: ..... 0.680 EU/mL
Spike Rxn Time CV: ..... 17.9% Pass
Spike Recovery: ..... 61% Pass
Test Suitability: ..... Pass
Sample #1 Value: ..... <0.050 EU/mL
Sample #2 Value: ..... <0.050 EU/mL
Sample Value: ..... <0.050 EU/mL
$4ef29b6b0426d74f68f54afdf515018c9cc1eeef0

```

Рис. 3.6. Повний протокол аналізу на вміст ендотоксинів в зразку культурального середовища.

Наявність росту мікроорганізмів у поживних середовищах можна було б оцінити і візуально (каламуть, плівка, осад, включення), але біоаналізатор дає вищу точність результатів, що є особливо важливим при ін'єкційному введенні готового препарату. Для забезпечення необхідної супроводжуючої документації нами направлялись зразки в лабораторію-контрагент, де суспензію клітин діагностували для визначення забруднення інфекційними

агентами методом полімеразної ланцюгової реакції на наявність вірусних та паразитарних інфекцій. Отримані результати були задовільними – в зразках не виявили збудників HIV1/-HIV2, HbsAg, HCV, HBV, HSV 1/2, CMV, *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Chlamidii*, EBV.

Отриманий клітинний продукт з фрагментів пупкового канатику також супроводжувався відповідним паспортом біотехнологічного продукту, де вказано кількість клітин, їх життєздатність та об'єм препарату. Згідно цих сертифікатів кількість МСК в одному препараті варіювала від 15 до 20 млн клітин. Життєздатність у всіх препаратах була 95 – 98%. Транспортувався до лікувальної установи готовий продукт в термобоксі, з дотриманням температурного режиму, для забезпечення максимального збереження усіх властивостей клітин.

3.2. Відновлення еректильної функції

Щоб оцінити вплив виготовленого продукту на відновлення еректильної функції ми відібрали учасників, що мали цукровий діабет II типу та виражену сексуальну дисфункцію, не мали протипоказань до клітинної терапії. В дослідженні прийняли участь чоловіки наступних вікових категорій: 25 років (1), 35-45 (1), 45-55 (6), 55-65 (4), 65+(1). Для візуалізації розподілу нижче наведено діаграму (рис. 3.7).

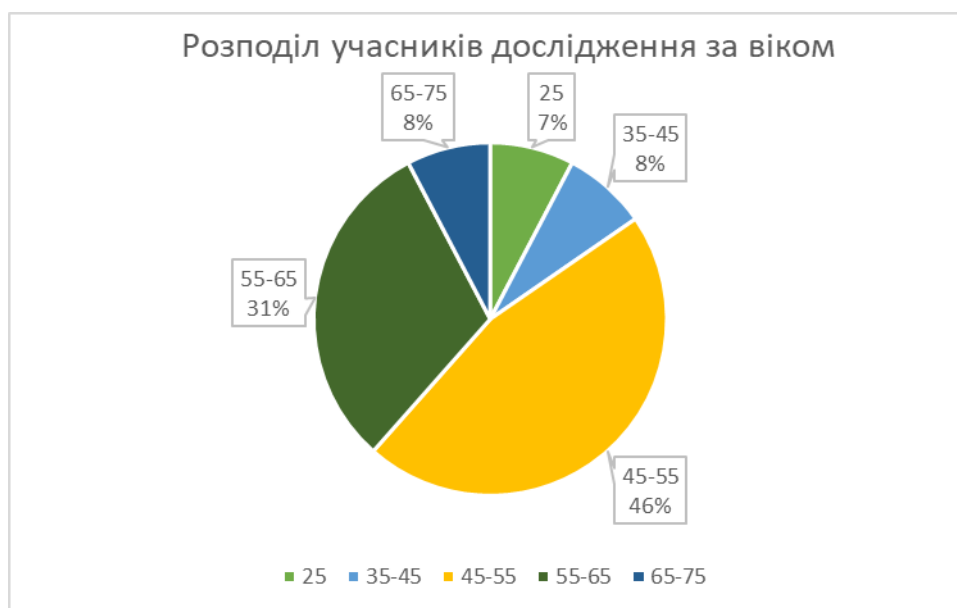


Рис. 3.7. Віковий розподіл учасників дослідження.

Аналіз демографічних характеристик пацієнтів показав, що 69% чоловіків були одруженими, 15% – ні, більше 14% були розлученими або вдівцями. Неодружені чоловіки не мали постійних сексуальних партнерів й вказували на важкість їх пошуку через наявні проблеми з ерекцією. Більшість одружених чоловіків (7 з 9) відчували значний психологічний дискомфорт в стосунках через відсутність бажаного рівня сексуальної активності. Усі учасники відзначали підвищення тривожності й невпевненість при спілкуванні з чинними або потенціальними партнерами.

Аналіз відповідей пацієнтів сприяв виокремленню основних еректильних проблем. Більшість чоловіків (62%) не могли досягнути ерекції взагалі, у 23% ерекція була недостатньою для проникнення, а в 15% спостерігались труднощі в підтриманні ерекції впродовж статевого акту. Якщо говорити про розподіл даних кейсів відносно причин виникнення ЕД, то 100% пацієнтів з органічною ЕД та 86% з групи зі змішаними причинами не досягали ерекції протягом 6 останніх місяців взагалі, 1 учасник зі змішаною ЕД мав недостатню для penetрації ерекцію. Пацієнти групи з психогенною етіологією ЕД або мали проблеми з penetрацією (50%), або не могли підтримувати належну ерекцію протягом статевого акту (50%).

Для візуалізації результати щодо здатності до пенетрації представлені у вигляді графіка (рис. 3.8). Видно, що пацієнти з органічними причинами ЕД в середньому набрали 1,5 бала (майже ніколи або кілька разів досягали ерекції достатньої для пенетрації протягом останніх 6 місяців), трохи кращі результати в групі зі змішаними причинами виникнення ЕД – 1,7 бала. Найвищий результат у тих, хто мав психогенну природу ЕД – більше 2 балів (іноді досягали ерекції достатньої для пенетрації протягом останніх 6 місяців). Максимально можливий бал в даному питанні – 5, жоден з учасників не мав результату вище 4 балів, що вказує на успішну пенетрацію лише в половині статевих актів.

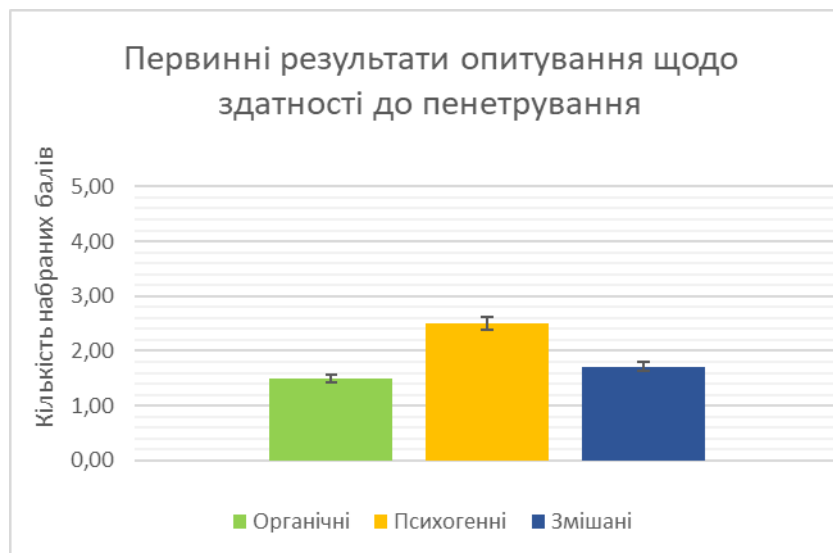


Рис. 3.8. Первинні середні результати опитування щодо здатності до пенетрації при статевому акті.

З метою позитивного впливу на незадовільний стан пацієнти однократно отримали ін'єкції в кавернозні тіла пенісу. Згідно нашого досвіду та наявних літературних джерел було обрано оптимальне дозування – 50 млн МСК в 3 мл фізіологічного розчину [3, 39]. Даний продукт супроводжувався біотехнологічним паспортом. Введення проводилось персоналом відповідної кваліфікації в медичній установі. Після процедури очікувались можливі побічні реакції – почервоніння, гематоми, незначний набряк, короткострокове підвищення температури тощо. За рахунок високої чутливості місця введення

пацієнтів попереджали про виражені больові відчуття в процесі. Основна проблема будь-якої трансплантації — імунна відповідь організму реципієнта на трансплантат. Т-клітини реципієнта та антитіла борються з клітинами чужорідного органу. Причина реакцій відторгнення полягає в різній структурі поверхні клітин, зокрема відмінності антигенів гістосумісності (антигени МНС або HLA) клітинних мембран живих істот. Ця поверхнева структура визначається генетично, тому кожна людина має свою структуру клітинної поверхні. Ми не використовували імуносупресивну терапію ні до, ні після інфузії алогенних стовбурових клітин пацієнтам – мезенхімальні стовбурові клітини мають знижену імуногенність (менше 4% клітинної популяції несли молекули HLA-DR), яка викликає відсутність гострої реакції відторгнення у пацієнтів.

Після процедури 76% пацієнтів вказали, що мали локальне почервоніння та набряклість протягом доби після введення. В одного учасника в місці ін'єкції виник невеликий синець, що зник протягом 3 діб. Інших побічних дій не було виявлено.

Через місяць після процедури учасники знову пройшли опитувальник ПЕФ (табл. 3.1). Під час анкетування пацієнтами не повідомлялось про жодні побічні реакції або погіршення стану здоров'я. Мезенхімальні стовбурові клітини демонструють імуномодулюючі, репаративні та протизапальні властивості, які, як правило, пояснюються переважною локалізацією до пошкоджених тканин і секрецією гуморальних (або паракринних чи цитокінових) факторів – тому, позитивний вплив прогнозувався вже на цьому етапі.

Таблиця 3.1

Оцінка здатності до пенетрації при статевому акті через 1 місяць після введення МСК (max 5 балів)

Група ЕД	Пацієнт	К-сть набраних балів	Середнє значення в групі
Органічна ЕД	А	2	2
	В	2	

Психогенна ЕД	C	3	3
	D	4	
	E	3	
	F	2	
Змішана ЕД	G	2	2,43
	H	3	
	I	1	
	J	3	
	K	3	
	L	3	
	M	2	

В нашій роботі ми порівняли результати в групах до та після введення. Окремо розглядали данні кожного пацієнта, щоб краще розуміти індивідуальний прогрес учасників. Так, пацієнти з групи органічної ЕД мали ідентичні результати – по 2 бали кожен (це означає, що пенетрація відбулась менше, ніж в половині випадків). Результати в групі з психогенними причинами були очікувано кращими, адже і первинні скарги пацієнтів не вказували на повну відсутність ерекції. До того ж еректильна дисфункція психогенної форми часто виникає у молодших людей на тлі високої напруженості відносин між партнерами, депресивного стану, гормональних порушень або проблем психологічного характеру. Саме представник цієї групи досягнув максимального (4 бали – пенетрація відбулась більше, ніж в половині випадків) на даному етапі значення серед 13 учасників. Учасники останньої групи продемонстрували найбільш розріднені результати. Пацієнт І не зміг досягнути ерекції, достатньої для пенетрації, двоє учасників змогли пенетрувати при статевому акті менше, ніж в половині разів. В 57% учасників зі змішаними причинами ЕД пенетрація відбулась рівно в половині статевих актів. Ми вважаємо, що поліпшення еректильної функції опосередковане невідомими гуморальними факторами (фактори росту/цитокіни/паракринні фактори), що виділялись введенними клітинами. Дивлячись на невеликий термін клітини ще б не встигли диференціюватись навіть після успішної імплантації.

Варто зазначити, що 72% опитуваних заявили про підвищення сексуального потягу/бажання. Для з'ясування цього питання варто було б розглядати зміни рівня гормонів у пацієнтів до та після введення, бо на підвищення лібідо могли впливати різні психологічні фактори, а не клітинна терапія.

Наступне опитування провели через 3 місяці після введення (табл. 3.2). На даному етапі пацієнтами не повідомлялось про жодні побічні реакції або погіршення стану здоров'я. Ми прогнозували, що результати покращаться – дані літератури вказують на посилення впливу СК (після їх трансплантації) з плином часу [3, 32, 39].

Таблиця 3.2

Оцінка здатності до пенетрації при статевому акті через 3 місяці після введення МСК (max 5 балів)

Група ЕД	Пацієнт	К-сть набраних балів	Середнє значення в групі
Органічна ЕД	А	2	2,5
	В	3	
Психогенна ЕД	С	3	3,25
	Д	4	
	Е	3	
	Ф	3	
Змішана ЕД	Г	3	3,14
	Н	3	
	І	2	
	Ж	4	
	К	3	
	Л	4	
	М	3	

Один пацієнт з групи органічної ЕД мав ідентичні до попереднього опитування результати (2 бали, що означає пенетрацію менше, ніж в половині статевих актів), а інший зміг досягти пенетрації в половині випадків. 75% учасників групи з психогенними причинами виниклої ЕД продемонстрували здатність пенетрувати партнера в половині кейсів сексу. При цьому більшість

учасників не підвищили попередні результати – ми пояснюємо це неспецифічними для клітинної терапії причинами виникнення ЕД. Припущено, що комплексне вживання певних лікарських засобів або вітамінів (наприклад, заспокійливих) могло б швидше призвести до покращення результатів. Отримані бали учасниками групи змішаної ЕД були більш однорідними – навіть пацієнт І досягнув ерекції, достатньої для penetрації, хоча і менше, ніж в половині статевих актів. 29% пацієнтів з ЕД змішаної етіології досягнули 4 балів (свідчить про успішну penetрацію в більшій частині випадків), 57% – оцінили свою пенетративну здатність на 3 бали (успіх в 50% випадків).

Отже, другий етап анкетування показав, що 85% чоловіків досягали ерекції, достатньої для penetрації, мінімум в половині випадків сексу. Кожен 3 з них оцінював свою пенетративну здатність на 4 бали. Для порівняння лише 1 чоловік мав такий бал після першого місяця від введення клітинного продукту і жоден з учасників не мав такої змоги до початку лікування.

Активация ендогенних стовбурових клітин у кавернозній тканині гуморальними факторами або факторами, що виділяються самими стовбуровими клітинами, може бути механізмом, що лежить в основі покращень при діабетичній еректильній дисфункції.

Останнє опитування проводилось на 6 місяць після введення. Учасники не повідомляли про прояви побічних реакцій або погіршення стану здоров'я. Отриманні результати представлені нижче (табл. 3.3). Прогнозувалось, що в разі успішної імплантації ефект від клітинної терапії буде пролонгованим (адже клітини не тільки стануть джерелом цитокінів, гуморальних та факторів росту, екзосом тощо, а й зможуть поповнити клітинну популяцію). Показанні бали певним чином підтверджують наші сподівання. Терапія стовбуровими клітинами, як самостійний метод, покращила багато показників, пов'язаних з еректильною дисфункцією; це вказує на те, що стовбурові клітини можуть відігравати важливу роль у корекції або полегшенні діабетичної еректильної

дисфункції. Припущено, що введений препарат впливає на відновлення ендотелію, впливає на активацію/деактивацію азотсинтази.

Таблиця 3.3

**Оцінка здатності до пенетрації при статевому акті через 6 місяців
після введення МСК (max 5 балів)**

Група ЕД	Пацієнт	К-сть набраних балів	Середнє значення в групі
Органічна ЕД	А	3	3
	В	3	
Психогенна ЕД	С	4	3,75
	Д	4	
	Е	3	
	Ф	4	
Змішана ЕД	Г	4	3,86
	Н	4	
	І	3	
	Ж	5	
	К	3	
	Л	5	
	М	3	

Так, пацієнти з групи органічної ЕД мали ідентичні результати – по 3 бали кожен (це означає, що пенетрація відбулась в половині випадків). Результати в групі з психогенними причинами були очікувано кращими, адже і первинні скарги пацієнтів не вказували на повну відсутність ерекції. 75% представників цієї групи досягнули того, що пенетрація відбулась більше, ніж в половині випадків. Один з учасників групи не покращив своїх результатів відносно отриманих на попередньому етапі (оцінив свою пенетративну здатність на 3 бали). Учасники групи зі змішаними причинами ЕД продемонстрували найбільш вражаючі результати. Пацієнт І досягав ерекції, достатньої для пенетрації, в половині випадків сексу. Двоє учасників оцінили свою можливість на максимальний бал – успішна пенетрація спостерігалась при кожному статевому акті. В 42% учасників зі змішаними причинами ЕД

пенетрація відбулась рівно в половині статевих актів, в 29% – більше, ніж в половині випадків.

До уваги на всіх етапах експерименту брали й відповіді на інші запитання анкети. Усі пацієнти в цьому дослідженні повідомили про підвищення лібідо, причиною якого могло бути кілька факторів. Для з'ясування цього питання в майбутньому варто розглядати зміни рівня гормонів у пацієнтів до та після лікування. Також на підвищення лібідо міг впливати психологічний стан пацієнтів (більше 85% вказували, що почувають себе впевненішими, 37% заявили, що дуже задоволені своїм сексуальним життям, а 100% вказали, що однозначно задоволені результатами лікування). Тому, ми вирішили не оцінювати цей параметр з точки зору відновлення після клітинної терапії.

Нами прогнозувалось системне поширення деяких інфузійних стовбурових клітин через кровотік, а також передбачалось їх переміщення до хворих/пошкоджених органів (наприклад, підшлункової залози). Такі СК зможуть сприятливо вплинути на перебіг цукрового діабета II типу (можливо, призведуть до зниження рівня глюкози), серцево-судинні порушення, які наявні в 23% учасників дослідження [11], нервові ускладнення (8% учасників) [40] тощо. В даній роботі ці показники не аналізувались, але майбутні роботи можна значно розширити й доповнити шляхом проведення скринінгів за додатковими параметрами.

Отже, повернемося до аналізу отриманих результатів. Для зручності порівняння усі дані, наведені в таблицях вище, представлено у вигляді графіка (рис. 3.9).

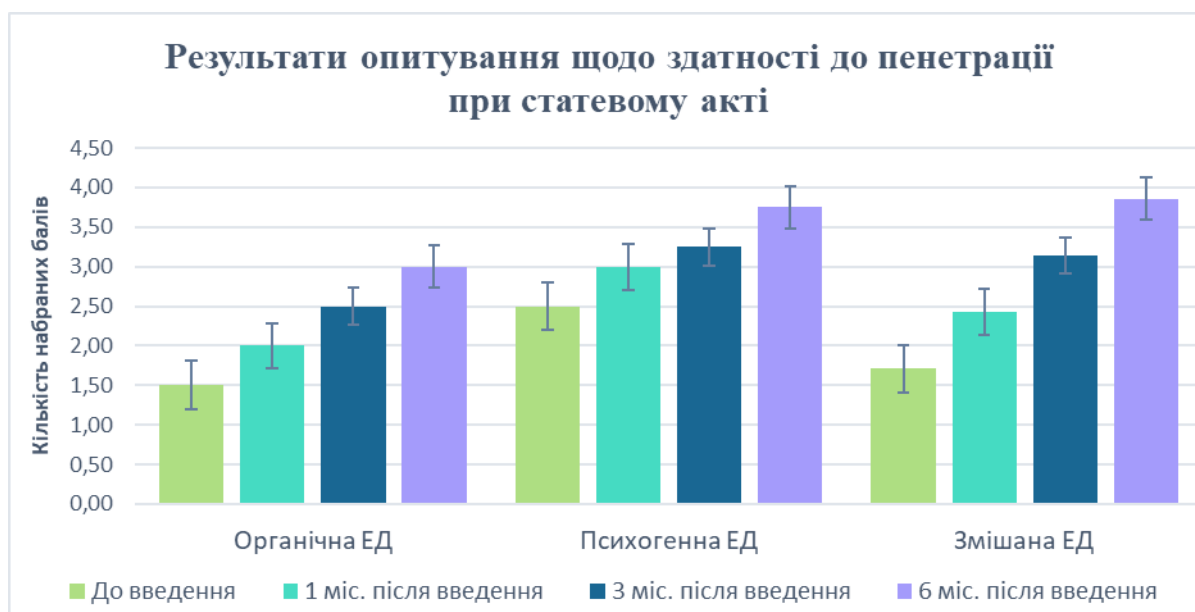


Рис. 3.9. Результати опитування щодо здатності до пенетрації при статевому акті до та після введення клітинного продукту.

Найвищі показники відновлення зафіксовано в групі змішаної ЕД (через 3 місяці показник виріс в 2,2 рази відносно вхідних даних); трохи нижчий рівень відновлення при органічній ЕД (через 3 місяці показник виріс в 2 рази), що пояснюється гіршим морфологічним станом тканин; в учасників з психологічними причинами виникнення ЕД на 3 місяць стан покращився в 1,5 рази відносно вхідних даних. З часом ефект від терапії ставав помітнішим – можливо, завдяки активації ендогенних стовбурових клітин у кавернозній тканині гуморальними факторами та факторами, що виділялись введенними клітинами.

Отже, МСК можуть використовуватися для лікування еректильної дисфункції у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу. ЕД у пацієнтів із цукровим діабетом 2 типу пов'язана з порушенням мікроциркуляції та пошкодженням ендотелію кровоносних судин пеніса. МСК можуть допомогти відновити пошкодженій ендотелій та покращити кровопостачання пеніса.

Механізм дії МСК при еректильній дисфункції у пацієнтів з цукровим діабетом 2 типу полягає в їх здатності диференціюватися в ендотеліальні

клітини та продукувати фактори росту, які можуть стимулювати ріст та ремоделювання кровоносних судин пеніса.

Коли МСК ін'єктуються в пеніс, вони можуть інтегруватися в пошкодженій ендотелій та диференціюватися в ендотеліальні клітини, що покращує мікроциркуляцію та кровопостачання пеніса. Крім того, МСК можуть продукувати фактори росту, такі як вегетативний фактор росту ендотелію (VEGF) та фактор росту епітелію судин, які можуть стимулювати васкуляризацію та ремоделювання кровоносних судин пеніса, що також позитивно вплине на еректильну функцію.

ВИСНОВКИ

1. Мезенхімальні стовбурові клітини, виділені з пупкового канатика – перспективний засіб для лікування судинних порушень мікроциркуляторного русла, до яких можна віднести й діабет-асоційовану еректильну дисфункцію.
2. В роботі поглиблено знання щодо сучасних методів культивування, які дозволяють отримати ефективний та безпечний клітинний продукт для подальшого застосування в медичній практиці – наші клітини продемонстрували достатню пластичність в стандарних умовах культури, фенотипову відповідність вимогам Міжнародного товариства клітинної терапії (більше 98% популяції несли маркери CD105, CD73 і CD90) та високу диференційну здатність (в середньому більше 96% клітин продиференціювали в адипо-, хондро- або остео-напрямках).
3. Результати відновлення здатності до проникнення в учасників дослідження спостерігались в усіх групах. З часом ефект від терапії ставав помітнішим – можливо, завдяки активації ендогенних стовбурових клітин у кавернозній тканині гуморальними факторами та факторами, що виділялись введеними клітинами.
4. Найвищі показники відновлення зафіксовано в групі змішаної еректильної дисфункції (через 3 місяці показник виріс в 2,2 рази відносно вхідних даних); трохи нижчий рівень відновлення при органічній ЕД (через 3 місяці показник виріс в 2 рази), що пояснюється гіршим морфологічним станом тканин; в учасників з психологічними причинами виникнення еректильної дисфункції на 3 місяць стан покращився в 1,5 рази відносно вхідних даних.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Rocha R.B., Silva C.S., Cardoso V.S. (2020) Self-Care in Adults with Type 2 Diabetes Mellitus: A Systematic Review. *Curr Diabetes Rev*, [online] Available at: doi 10.2174/1573399815666190702161849.
2. Kao K.T., Sabin M.A. (2016) Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *Aust Fam Physician*, [online] Available at: PMID 27622231.
3. Bahk J.Y., Jung J.H., Han H., Min S.K., Lee Y.S. (2010) Treatment of diabetic impotence with umbilical cord blood stem cell intracavernosal transplant: preliminary report of 7 cases. *Exp Clin Transplant*, [online] Available at: PMID 20565373.
4. Chen F., Zhang H., Wang Z., Ding W., Zeng Q. (2017) Adipose-Derived Stem Cell-Derived Exosomes Ameliorate Erectile Dysfunction in a Rat Model of Type 2 Diabetes. *J Sex Med*, [online] Available at: doi 10.1016/j.jsxm.2017.07.005.
5. Laakso M. (2019) Biomarkers for type 2 diabetes. *Mol Metab*, [online] Available at: doi 10.1016/j.molmet.2019.06.016, PMID 31500825.
6. Zheng Y., Ley S.H., Hu F.B. (2018) Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*, [online] Available at: doi 10.1038/nrendo.2017.151.
7. Christian P., Stewart C.P. (2010) Maternal micronutrient deficiency, fetal development, and the risk of chronic disease. *The Journal of nutrition*, [online] Available at: doi 10.3945/jn.109.116327.
8. Artasensi A., Pedretti A., Vistoli G., Fumagalli L. (2020) Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Multi-Target Drugs. *Molecules*, [online] Available at: doi 10.3390/molecules25081987.
9. Halim M., Halim A. (2019) The effects of inflammation, aging and oxidative stress on the pathogenesis of diabetes mellitus (type 2 diabetes). *Diabetes Metab Syndr*, [online] Available at: doi 10.1016/j.dsx.2019.01.040.

10. Buttermore E., Campanella V., Priefer R. (2021) The increasing trend of Type 2 diabetes in youth: An overview. *Diabetes Metab Syndr*, [online] Available at: doi 10.1016/j.dsx.2021.102253.
11. Henning R.J. (2018) Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Future Cardiol.*, [online] Available at: doi 10.2217/fca-2018-0045.
12. Faselis C., Katsimardou A., Imprialos K., Deligkaris P., Kallistratos M., Dimitriadis K. (2020) Microvascular Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Vasc Pharmacol.* [online] Available at: doi 10.2174/1570161117666190502103733.
13. Yuan C., Jian Z., Gao X., Jin X., Wang M., Xiang L., Wang K. (2021) Type 2 diabetes mellitus increases risk of erectile dysfunction independent of obesity and dyslipidemia: A Mendelian randomization study. *Andrology.* [online] Available at: doi 10.1111/andr.13132.
14. Gianatti E.J., Grossmann M. (2020) Testosterone deficiency in men with Type 2 diabetes: pathophysiology and treatment. *Diabet Med*, [online] Available at: doi 10.1111/dme.13977.
15. Tamrakar D., Bhatt D.S., Sharma V.K., Poudyal A.K., Yadav B.K. (2021) Association Between Erectile Dysfunction and Type 2 Diabetes Mellitus. *J Nepal Health Res Counc*, [online] Available at: doi 10.33314/jnhrc.v19i2.3394.
16. Azad A.K., Setunge S., Selim S., Chowdhury S.H., Rahaman M.F., Karim M.N. (2018) Dyslipidaemia as a risk factor for erectile dysfunction in type 2 diabetes mellitus patients. *Diabetes Metab Syndr*. [online] Available at: doi 10.1016/j.dsx.2018.11.052.
17. Pollakova D., Andreadi A., Pacifici F., Della-Morte D., Lauro D., Tubili C. (2021) The Impact of Vegan Diet in the Prevention and Treatment of Type 2 Diabetes: A Systematic Review. *Nutrients*, [online] Available at: doi 10.3390/nu13062123.
18. Picot J., Jones J., Colquitt J.L., Gospodarevskaya E., Loveman E. (2009) The clinical effectiveness and cost-effectiveness of bariatric (weight loss) surgery

- for obesity: a systematic review and economic evaluation. *Health technology assessment*, [online] Available at: doi 10.3310/hta13410.
19. Ripsin C.M., Kang H., Urban R.J. (2009) Management of blood glucose in type 2 diabetes mellitus. *Am Fam Physician*, [online] Available at: PMID 19145963.
 20. Defeudis G., Mazzilli R., Tenuta M., Rossini G., Zamponi V., Olana S., Gianfrilli D. (2021) Erectile dysfunction and diabetes: A melting pot of circumstances and treatments. *Diabetes Metab Res Rev*. [online] Available at: doi 10.1002/dmrr.3494.
 21. Artasensi A., Pedretti A., Vistoli G., Fumagalli L. (2020) Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Multi-Target Drugs. *Molecules*. [online] Available at: PMID 32340373.
 22. Nauck M.A., Wefers J., Meier J.J. (2021) Treatment of type 2 diabetes: challenges, hopes, and anticipated successes. *Lancet Diabetes Endocrinol*. [online] Available at: doi 10.1016/S2213-8587(21)00113-3.
 23. Ramírez-Alarcón K., Victoriano M., Mardones L., Villagran M., Martorell M. (2021) Phytochemicals as Potential Epidrugs in Type 2 Diabetes Mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)*. [online] Available at: doi 10.3389/fendo.2021.656978.
 24. Javeed N., Matveyenko A.V. (2018) Circadian Etiology of Type 2 Diabetes Mellitus. *Physiology (Bethesda)*, [online] Available at: doi 10.1152/physiol.00003.2018.
 25. Defeudis G., Mazzilli R., Tenuta M., Rossini G., Zamponi V., Gianfrilli D. (2022) Erectile dysfunction and diabetes: A melting pot of circumstances and treatments. *Diabetes Metab Res Rev*. [online] Available at: doi 10.1002/dmrr.3494.
 26. Triggle C.R., Mohammed I., Bshesh K., Marei I., Ye K., Ding H., Hill M.A. (2022) Metformin: Is it a drug for all reasons and diseases? *Metabolism*. [online] Available at: doi 10.1016/j.metabol.2022.155223.

27. Bajaj H.S., Gerstein H.C., Rao-Melacini P., Basile J., Colhoun H., Xavier D. (2021) Erectile function in men with type 2 diabetes treated with dulaglutide: an exploratory analysis of the REWIND placebo-controlled randomised trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* [online] Available at: doi 10.1016/S2213-8587(21)00115-7.
28. Madsbad S. (2021) Dulaglutide for erectile dysfunction in type 2 diabetes. *Lancet Diabetes Endocrinol.* [online] Available at: doi 10.1016/S2213-8587(21)00142-X.
29. Yu C.G., Fu Y., Fang Y., Zhang N., Sun R.X., Zhao D., Feng Y.M., Zhang B.Y. (2019) Fighting Type-2 Diabetes: Present and Future Perspectives. *Curr Med Chem*, [online] Available at: doi 10.2174/0929867324666171009115356.
30. He Q., Wang L., Zhao R., Yan F., Chen L. (2022) Retraction Note: Mesenchymal stem cell-derived exosomes exert ameliorative effects in type 2 diabetes by improving hepatic glucose and lipid metabolism via enhancing autophagy. *Stem Cell Res Ther.* [online] Available at: doi 10.1186/s13287-022-03191-6.
31. Galhom R.A., Korayem H.E., Ibrahim M.A., Khalifa M.M., Badawi M.H. (2022) Urine-Derived Stem Cells Versus Their Lysate in Ameliorating Erectile Dysfunction in a Rat Model of Type 2 Diabetes. *Front Physiol.* [online] Available at: doi 10.3389/fphys.2022.854949.
32. Feng H., Liu Q., Deng Z., Li H., Zhang H., Song J., Liu X., Wang T. (2022) Human umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate erectile dysfunction in rats with diabetes mellitus through the attenuation of ferroptosis. *Stem Cell Res Ther.* [online] Available at: doi 10.1186/s13287-022-03147-w.
33. Calogero A.E., Burgio G., Condorelli R.A., Cannarella R., La Vignera S. (2019) Epidemiology and risk factors of lower urinary tract symptoms/benign prostatic hyperplasia and erectile dysfunction. *Aging Male.* [online] Available at: doi 10.1080/13685538.2018.1434772.

34. Vallejo-Medina P., Saffon J.P., Álvarez-Muelas A. (2022) Colombian Clinical Validation of the International Index of Erectile Function (IIEF-5). *Sex Med.* [online] Available at: doi 10.1016/j.esxm.2021.100461.
35. Rosen R.C., Cappelleri J.C., Gendrano N. (2002) The International Index of Erectile Function (IIEF): a state-of-the-science review. *Int J Impot Res.* [online] Available at: doi 10.1038/sj.ijir.3900857.
36. Wysoczynski M., Khan A., Bolli R. (2018) New Paradigms in Cell Therapy: Repeated Dosing, Intravenous Delivery, Immunomodulatory Actions, and New Cell Types. *Circ Res.* [online] Available at: doi 10.1161/CIRCRESAHA.118.313251.
37. Vinod E., Padmaja K., Livingston A, et al. (2021) Prospective Isolation and Characterization of Chondroprogenitors from Human Chondrocytes Based on CD166/CD34/CD146 Surface Markers. *Cartilage.* [online] Available at: doi 10.1177/19476035211042412.
38. Portugal J., Waring M.J. (1988) Assignment of DNA binding sites for 4',6-diamidine-2-phenylindole and bisbenzimidazole (Hoechst 33258). A comparative footprinting study. *Biochim Biophys Acta.* [online] Available at: doi 10.1016/0167-4781(88)90079-6.
39. Hoang D.M., Pham P.T., Bach T.Q, et al. (2022) Stem cell-based therapy for human diseases. *Signal Transduct Target Ther,* [online] Available at: doi 10.1038/s41392-022-01134-4.
40. Cabou C., Burcelin R. (2011) GLP-1, the gut-brain, and brain-periphery axes. *Rev Diabet Stud,* [online] Available at: doi 10.1900/RDS.2011.8.418.