

Съвременна Медицина

Modern
medicine

LXVIII 1-2/2024



Съюз на българските медицински специалисти

1-2/2024

LXVIII



Съвременна медицина

Орган на Съюза на българските медицински специалисти

РЕДАКЦИОННА КОЛЕГИЯ

Главен редактор:

Проф. Б. Богов

E-mail: bbogov@gmail.com

Зам. гл. редактор:

Проф. Зл. Коларов

E-mail: zkolarov@abv.bg

Научен секретар:

Доц. Р. Кръстева

E-mail: krasteva_r@yahoo.com

Членове:

Чл.-кор. проф. А. Гудев

Проф. А. Ионков

Проф. А. Постаджиян

Доц. В. Василев

Доц. В. Велчев

Доц. В. Гегусков

Проф. Г. Куртева

Проф. Д. Буланов

Проф. Д. Генов

Проф. Д. Желев

Проф. Д. Костадинов

Проф. Д. Свиначков

Доц. Д. Цонева-Тобова

Проф. Е. Наумова

Доц. Е. Хаджиев

Проф. З. Каменов

Проф. И. Салтиров

Проф. К. Антонов

Проф. К. Карамфилов

Доц. К. Рамшев

Проф. К. Янев

Акад. проф. Л. Трайков

Доц. М. Атанасова

Проф. М. Георгиев

Проф. М. Любомирова

Доц. М. Николова

Проф. Н. Габровски

Доц. Р. Иванова

Проф. Р. Петков

Проф. С. Монов

Доц. С. Ценов

Доц. Т. Гатева

Проф. Т. Седлоев

Проф. Ю. Петрова

СЪДЪРЖАНИЕ

Оригинални статии

Г. Цветкова, С. Кандиларова, М. Иванова, Е. Бекирова, М. Райковска, Г. Вълчев, Г. Балаценко, С. Христова, Е. Хаджиев. Инфламаторни цитокини при пациентите с миелопротрофиеративни неоплазии – цитокинов профил и клинично-лабораторни корелации при полицитемия вера 3

Обзори

В. Червенков, М. Недева, А. Дачева, Г. Славчев. Преглед на съвременните терапевтични възможности при пароксизмална нощна хемоглобинурия в България 12

Т. Веков, Г. Димитров, Т. Самарджиев, Б. Борисов. Тъканно инженерство, базирано на стволови клетки и различни биотехнологични методи 19

Т. Веков, С. Джамбазов, В. Белчева. Регулация на лекарствените продукти за генна и клетъчна терапия в ЕС и САЩ – сравнителен анализ 30

Адрес на редакцията:

СБМС, София, 1431, ПК-63, ул. "Св. Георги Софийски" № 1

ISSN 0562-7192

Original article

- G. Tsvetkova, S. Kandilarova, M. Ivanova, E. Bekirova, M. Raykovska, G. Valchev, G. Balatzenko, S. Hristova, E. Hadjiev.* Inflammatory cytokines in patients with myeloproliferative neoplasms – cytokine profile, clinical and laboratory correlations in polycythemia vera 3

Reviews

- V. Chervenkov, M. Nedeva, A. Dacheva, G. Slavchev.* Review of current treatment options for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Bulgaria..... 12
- T. Vekov, G. Dimitrov, T. Semerdzhiev, B. Borisov.* Stem-cell-based tissue engineering and varied biotechnological methods 19
- T. Vekov, S. Djambazov, V. Belcheva.* Regulation of gene and cell therapy medicinal products in the EU and the USA – a comparative analysis 30

EDITORIAL BOARD

Editor in chief:

Prof. B. Bogov

E-mail: bbogov@gmail.com

Deputy editor:

Prof. Zl. Kolarov

E-mail: zkolarov@abv.bg

Scientific secretary:

Assoc. Prof. R. Krasteva

E-mail: krasteva_r@yahoo.com

Editorial staff:

Corr. memb. Prof. A. Gudev

Prof. A. Yonkov

Prof. A. Postadjian

Assoc. Prof. V. Vasilev

Assoc. Prof. V. Velchev

Assoc. Prof. V. Geguskov

Prof. G. Kurteva

Prof. D. Bulanov

Prof. D. Genov

Prof. D. Zhelev

Prof. D. Kostadinov

Prof. D. Svinarov

Assoc. Prof. D. Tsoneva-Tobova

Prof. E. Naumova

Assoc. Prof. E. Hadzhiev

Prof. Z. Kamenov

Prof. I. Saltirov

Prof. K. Antonov

Prof. K. Karamfilov

Assoc. Prof. K. Ramshev

Prof. K. Yanev

Acad. Prof. L. Traykov

Assoc. Prof. M. Atanasova

Prof. M. Georgiev

Prof. M. Lyubomirova

Assoc. Prof. M. Nikolova

Prof. N. Gabrovski

Assoc. Prof. R. Ivanova

Prof. R. Petkov

Prof. S. Monov

Assoc. Prof. S. Tsenov

Assoc. Prof. T. Gateva

Prof. T. Sedloev

Prof. Yu. Petrova

Editorial address:

UNION OF MEDICAL SPECIALISTS IN BULGARIA

1, Sv. G. Sofiysky, Sofia 1431 Bulgaria

СЪВРЕМЕННА МЕДИЦИНА 1-2/2024



Централна медицинска библиотека, МУ – София

Езикова редакция: *И. Митева, В. Колев (англ.)*Страниране: *Д. Александрова*

Печат: j-point plus

ИНФЛАМАТОРНИ ЦИТОКИНИ ПРИ ПАЦИЕНТИТЕ С МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНИ НЕОПЛАЗИИ – ЦИТОКИНОВ ПРОФИЛ И КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНИ КОРЕЛАЦИИ ПРИ ПОЛИЦИТЕМИЯ ВЕРА

Г. Цветкова¹, С. Кандиларова², М. Иванова², Е. Бекирова¹, М. Райковска¹, Г. Вълчев¹,
Г. Балаценко³, С. Христова⁴, Е. Хаджиев¹

¹Клиника по клинична хематология, УМБАЛ “Александровска”, Медицински университет – София

²Клиника по клинична имунология с банка за стволови клетки, УМБАЛ “Александровска”,
Медицински университет – София

³Национална специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания – София

⁴Клиника по обща и клинична патология, УМБАЛ “Александровска”,
Медицински университет – София

Резюме. Миелопролиферативните неоплазии (МПН) са група заболявания с хетерогенни прояви и често прогресивен ход. В последните години се отчита значителен напредък в разбиранията относно патогенезата и подходите за терапевтичното им повлияване, но идентифицираните молекулярни маркери и сигнални пътища не обясняват изцяло разнородната симптоматика и усложнения при пациентите. Обсъжда се ролята на хроничното възпаление като фактор, съучастващ в патогенезата и прогресията на МПН. Наред с цитокинов профил на първичната миелофиброза (ПМФ), повишени нива на цитокини са описани и при пациенти с полицитемия вера (ПВ) и есенциална тромбоцитемия (ЕТ). В настоящото проучване анализирахме серумните нива на панел от инфламаторни цитокини при 49 новодиагностицирани пациенти с ПВ и здрави контроли и потенциалните им корелации с проявите на заболяването. Установиха се повишени интерлевкин-6 (IL-6), IL-10 и IL-18 и понижен IL-12p70 при пациентите с ПВ в сравнение със здравите контроли. Налице бе асоциация на загубата на тегло с IL-6 и IL-18, както и на IL-6 със симптома умора. Корелационна зависимост демонстрираха интерферон-гама (IFN- γ) и стойностите на LDH, не бе потвърдена асоциация на цитокините с тромботични събития при ПВ и с размера на слезката. Получените резултати дават основание да се предполага корелация на цитокиновите нива с изявата и еволюцията на МПН и конкретно на ПВ.

Ключови думи: миелопролиферативни неоплазии, полицитемия вера, хронично възпаление, цитокини

INFLAMMATORY CYTOKINES IN PATIENTS WITH MYELOPROLIFERATIVE NEOPLASMS – CYTOKINE PROFILE, CLINICAL AND LABORATORY CORRELATIONS IN POLYCYTHEMIA VERA

G. Tsvetkova¹, S. Kandilarova², M. Ivanova², E. Bekirova¹, M. Raykovska¹, G. Valchev¹,
G. Balatzenko³, S. Hristova⁴, E. Hadjiev¹

¹Clinic of Clinical Hematology, University Hospital “Alexandrovskia”, Medical University – Sofia

²Clinic of Clinical Immunology with Stem Cell Bank, University Hospital “Alexandrovskia”,
Medical University – Sofia

³National Specialized Hospital for Active Treatment of Hematological Diseases, Sofia

⁴Department of General and Clinical Pathology, University Hospital Alexandrovskia, Medical
University – Sofia

Abstract. Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are a group of disorders with heterogeneous features and often progressive course. A remarkable advance has been made in the knowledge on their pathogenesis

and therapeutic approaches, but the recognized molecular markers and signaling pathways are not sufficient to explain the variable clinical symptoms and complications among these patients. The role of the chronic inflammation has been widely considered as a factor, involved in the pathogenesis and progression of MPNs. Together with the cytokine profile of primary myelofibrosis (PMF), increased cytokines have been reported in patients with polycythemia vera (PV) and essential thrombocythemia (ET). We analyzed the serum levels of a panel of inflammatory cytokines among 49 patients with PV and healthy controls and their potential correlations with the disease's characteristics. The results revealed elevated Interleukin-6 (IL-6), IL-10 and IL-18, together with decreased IL-12p70 in PV patients, compared with the healthy cohort. IL-6 and IL-18 demonstrated a positive correlation with the weight loss, IL-6 was associated with the fatigue severity. Interferon gamma (IFN-gamma) correlated with LDH level, there was no evidence of interrelationship between cytokines and thrombotic events or spleen size. Our study results give a ground to assume a correlation between the cytokine levels and MPNs clinical features and course, specifically for PV.

Key words: myeloproliferative neoplasms, polycythemia vera, chronic inflammation, cytokines

ВЪВЕДЕНИЕ

Хроничните миелопролиферативни неоплазии (МПН) са група хематологични заболявания с хетерогенни прояви и често прогресивен ход. Характеризират се с изразена пролиферация на миелоидните прогенитори на хемопоезата, водеща до експансия на левкоцити, еритроцити и тромбоцити в периферната кръв, със или без съпътстваща костномозъчна фиброза.

Въпреки разнородната им клинична картина МПН могат да демонстрират и частично припокриващи се лабораторни находки, симптоматика и усложнения. Съгласно класификацията на СЗО от 2016 г. основните обособени нозологични категории са: позитивната за BCR-ABL мутация хронична миелоидна левкемия и групата на BCR-ABL негативните МПН, в т.ч.: полицитемия вера (ПВ), есенциална тромбоцитемия (ЕТ), първична миелофиброза (ПМФ) и други, по-редки заболявания, като хронична неутрофилна левкемия, хронична еозинофилна левкемия и МПН – неклассифицируема [1, 2]. Според литературните данни честотата на новодиагностицирани случаи в Европа варира от 0,4 до 2,8 на 100 хил. души за ПВ, от 0,38 до 1,7 на 100 хил. души за ЕТ и от 0,1 до 1 на 100 хил. души за ПМФ [4].

С идентифицирането на мутацията в екзон 14 на гена, кодиращ тирозинкиназата Janus kinase 2 (JAK2), със субституция на аминокиселината валин с фенилаланин (V617F) и ролята ѝ в експанзията на патологичния миелоиден клон, в последните години се отчете значителен напредък в разбиранията относно патогенезата на МПН и подходите за терапевтичното им повлияване. Съвременната патогенетична теория се базира на тригерния ефект на придобитите активиращи мутации в гените, кодиращи определени тирозин кинази, както и на допълнителната поява на соматични мутации [5-10]. Тези генетични събития водят до променена вътреклетъчна сигнална трансдукция, доминиране на трансформирания клон над физиологичната хемопоеза и свръхпродукция на клетъчни елементи от миелоидния ред, при липса на нормален регулаторен стимул [11, 12]. JAK2 мутации са потвърдени при почти всички пациенти с ПВ и при около половината от случаите, диагностицирани с ЕТ и ПМФ [13].

Въпреки множеството разработки в областта идентифицираните генетични маркери и свързаните с тях сигнални пътища не обясняват изцяло разнородната симптоматика и усложнения при тези пациенти, както и молекулярните механизми, водещи до прогресия и фибротична трансформация [14]. Съществуват редица неразрешени въпроси, касаещи биологията, клиничния ход, прогнозата и лечението им.

Все по-често се обсъжда ролята на хроничното възпаление като фактор, съучастващ в

патогенезата на МПН. Редица изследвания в последните години потвърдиха инфламаторен компонент в патофизиологията на тази група заболявания, вторичен в генезата на неопластичния процес. Хроничното възпаление в костномозъчната микросреда се разглежда като фактор в клоналната експанзия и прогресия, потенциращ селективно пролиферативно предимство на малигнения клон [15-19].

Абнормната продукция на инфламаторни цитокини се асоциира със симптоматиката и костномозъчната находка при пациентите, както и с авансиращ ход на заболяването [21, 22]. Данни, че повишените нива на определени цитокини са необходими за разрастване на JAK2 V617F мутиралите еритроидни прогенитори при ПВ са представени от Boissinot и кол. [23]. Наред с подробните литературни данни за цитокинов профил на ПМФ, значимо повишени нива на цитокини са описани при анализ на пациенти с ПВ и ЕТ, докладвани са позитивни корелации на серумните им концентрации с биологичните характеристики и клиничните изяви на болестта [24-27].

ЦЕЛ НА ИЗСЛЕДВАНЕТО

В настоящото проучване анализирахме серумните нива на панел от цитокини, асоциирани с процесите на хронично възпаление, при пациенти с полицитемия вера и група здрави контроли и потенциалните им корелации с лабораторните и клиничните прояви на заболяването.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В изследването са включени 49 възрастни с полицитемия вера и 35 здрави контроли. Диагнозата на заболяването е поставена в съответствие със съвременните критерии на СЗО [3, 28, 29, 30]. Пробите от периферна кръв са взети съгласно стандартния протокол, при поставянето на диагнозата и преди стартиране на терапия, с последващо центрофугиране и съхранение на серума. Цитокиновите нива са изследвани в серумните проби с кит

„Cytokine Human Magnetic 25-Plex Panel for Luminex™. В анализа бяха включени: 1 растежен фактор (гранулоцитно-макрофагеален колонистимулиращ фактор – GM-CSF) и 10 цитокина, в т.ч. проинфламаторни: интерферон-гама (IFN-gamma), интерлевкин-2 (IL-2), Интерлевкин-5 (IL-5), интерлевкин-6 (IL-6), интерлевкин-8 (IL-8), интерлевкин-12p70 (IL-12p70), интерлевкин-18 (IL-18), тумор-некротичен фактор-алфа (TNF-α) и антиинфламаторни: IL-10, IL-13, лабораторни и физикални параметри и индивидуалната субективна симптоматика. За оценка на клиничните симптоми е използван въпросникът Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form (MPN-SAF) [31]. За обработка на данните е използван статистически софтуер SPSS, версия 20.0, сравнителен анализ е проведен с Mann-Whitney t test, за корелационен анализ на цитокиновите нива с основните клинично-биологични характеристики на заболяването е използван Spearman test, за калкулиране на прагови стойности – ROC анализ. За статистически значими са приети стойности на $p < 0.05$.

РЕЗУЛТАТИ

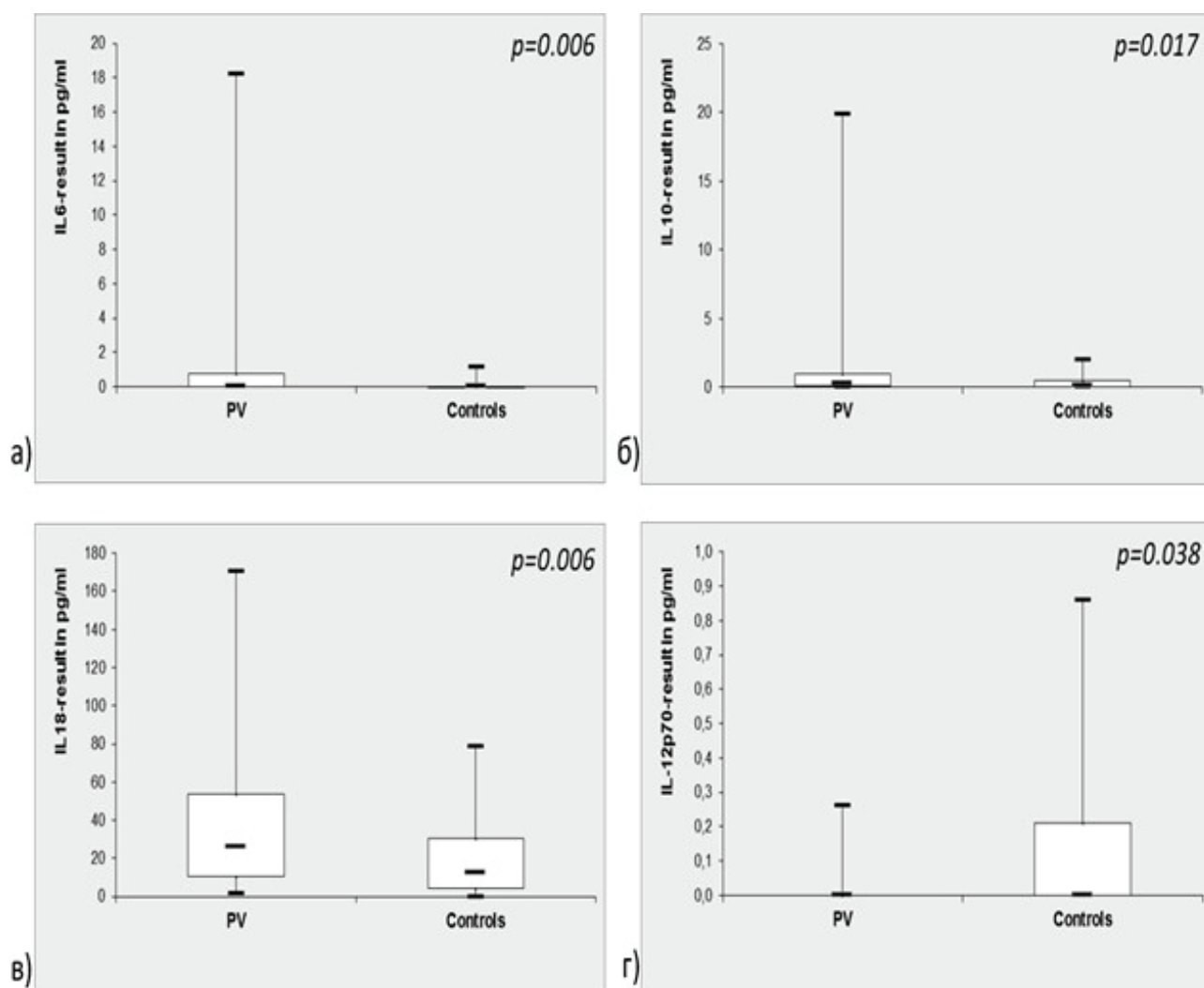
Включените в анализа 49 пациенти с ПВ са новодиагностицирани, нелекувани, на възраст между 42 и 86 години, средна възраст 64 години, 55% от тях от мъжки пол. При 38 от пациентите е потвърдено носителство на V617F мутация в JAK2 гена, 10 са с негативен мутационен статус, а при един пациент липсват данни от молекулярно-генетично изследване. Контролната група е възрастово балансирана с пациентската, с идентична средна възраст от 64 години (интервал 31-88 години), с 34% представители от мъжки пол. (табл. 1). Предвид възможните възрастови вариации в нивата на цитокините, разпределението във възрастови подгрупи, съответно < 65 г. и ≥ 65 г. е сходно в двете рамена [20]. Нивата на гранулоцитно-макрофагеалния колонистимулиращ фактор (GM-CSF) и 10 цитокина в двете групи бяха измерени в серумни проби в pg/ml и сравнени с Mann-Whitney

Test. Статистически значимо повишени стойности на IL-6, IL-10 и IL-18 бяха установени при пациентите с ПВ в сравнение със здрави-

те контроли (фиг. 1). Проинфламаторният IL-12p70 демонстрира понижени нива при пациентската спрямо контролната група ($p < 0.05$).

Таблица 1. Демографски характеристики на пациентите и контролната група

Групи	ПВ (n = 49)	Контроли (n = 35)
Възраст – год.: средна (интервал)	64 (42-86)	64 (31-88)
Мъже – брой (%)	27 (55)	12 (34)
< 65 години – брой (%)	25 (51)	17 (49)
≥ 65 години – брой (%)	24 (49)	18 (51)



Фиг. 1. Серумни нива на изследваните цитокини при пациентите с ПВ спрямо здрави контроли: а) средни нива на IL-6 (Mann-Whitney Test – $p = 0,006$); б) средни нива на IL-10 (Mann-Whitney Test – $p = 0,017$); в) средни нива на IL-18 (Mann-Whitney Test – $p = 0,006$); г) средни нива на IL-12p70 (Mann-Whitney Test – $p = 0,038$)

Останалите изследвани интерлевкини от панела, както и GM-CSF, не показаха сигнификантни разлики в средните серумни концентрации между пациентските проби и контролите (табл. 2). Корелационният анализ (Spearman's rho) не установи зависимост на нивата на нито един от 10-те цитокина от стойностите на възпалителния маркер С-реактивен протеин (CRP) в серума на пациентите към момента на вземане на пробата.

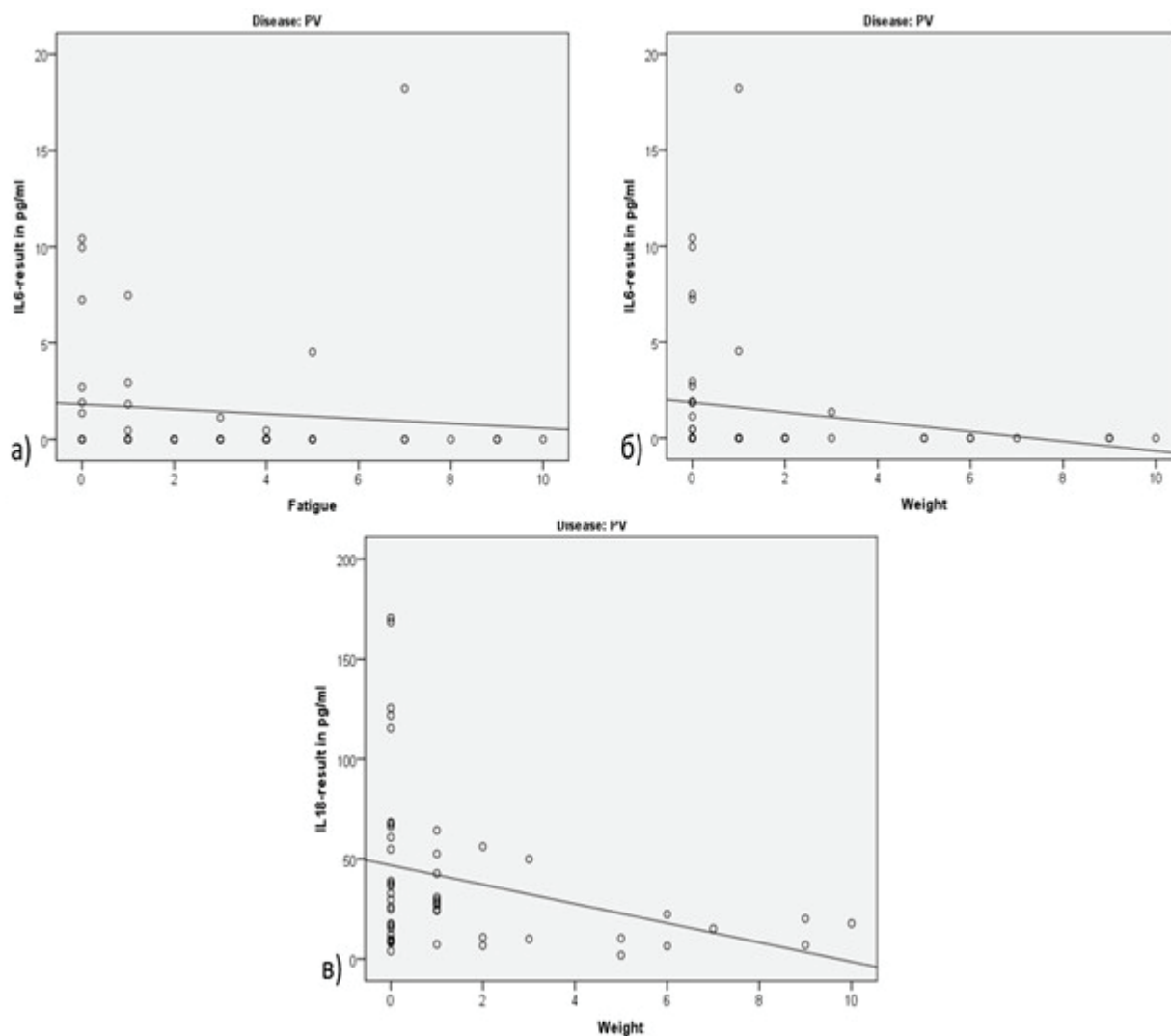
Анализиран бяха корелациите на серумните цитокини с фенотипните характеристики на заболяването при групата с ПВ, в т.ч. с изявата на разнообразна клинична симптоматика, оценена на анкетен принцип с валидирания въпросник MPN-SAF [31]. По отношение на докладваните от пациентите симптоми като умора, сърбеж, костна болка и загуба на тег-

ло бе налице статистически значима асоциация на степента на загуба на тегло със серумните нива на IL-6 ($p < 0,05$) и IL-18 ($p < 0,01$), както и на IL-6 с тежестта на симптома умора ($p < 0,05$) (фиг. 2).

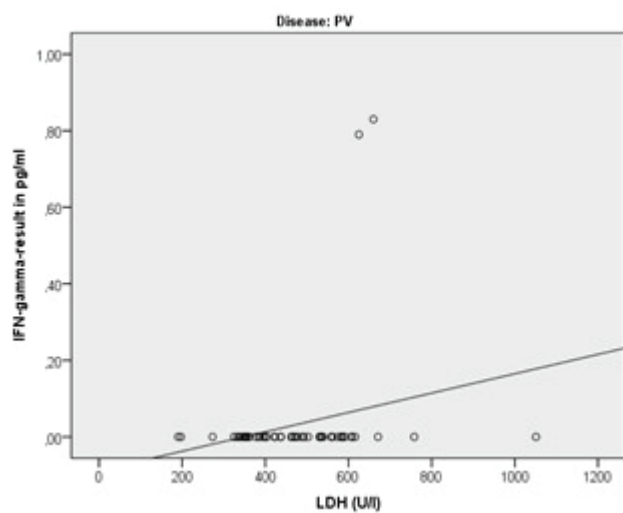
В изследването бе включена оценка на лабораторни параметри при групата с ПВ и потенциалните им зависимости от нивата на изследваните цитокини. Анализиран бяха показателите: скорост на утаяване на еритроцитите (СУЕ), хемоглобин, левкоцити, тромбоцити, бласти в диференциално броене на натривка от периферна кръв, еритробласти в диференциално броене на натривка от периферна кръв, фибриноген, лактат дехидрогеназа (LDH) и CRP. От изброените показатели корелационна зависимост ($p < 0,05$) демонстрираха нивото на IFN-gamma и стойностите на LDH (фиг. 3).

Таблица 2. Серумни нива на изследваните цитокини при пациентите с ПВ спрямо здрави контроли – описателна статистика и сравнителен анализ (Mann-Whitney test)

Цитокини (pg/ml)	Група	Mean	SD	Min	Max	P-value
GM-CSF	ПВ	0,81	1,94	0,00	10,58	0,139
	Контроли	0,30	0,93	0,00	4,98	
IFN-gamma	ПВ	0,03	0,16	0,00	0,83	n/a
	Контроли	0,00	0,00	0,00	0,00	
IL-10	ПВ	1,31	3,15	0,00	19,89	0,017
	Контроли	0,32	0,48	0,00	1,99	
IL-12p70	ПВ	0,03	0,07	0,00	0,26	0,038
	Контроли	0,11	0,19	0,00	0,86	
IL-13	ПВ	0,00	0,00	0,00	0,00	n/a
	Контроли	0,00	0,00	0,00	0,00	
IL-18	ПВ	39,00	39,97	1,82	170,40	0,006
	Контроли	18,82	17,89	0,00	78,39	
IL-2	ПВ	0,11	0,78	0,00	5,44	0,885
	Контроли	0,05	0,17	0,00	0,72	
IL-5	ПВ	2,31	8,39	0,00	47,77	0,906
	Контроли	0,35	0,82	0,00	3,86	
IL-6	ПВ	1,44	3,52	0,00	18,23	0,006
	Контроли	0,05	0,21	0,00	1,14	
IL-8	ПВ	9,73	22,87	0,37	154,58	0,204
	Контроли	4,24	4,44	0,00	17,60	
TNF-alpha	ПВ	0,42	0,71	0,00	3,11	0,831
	Контроли	0,80	2,07	0,00	9,26	



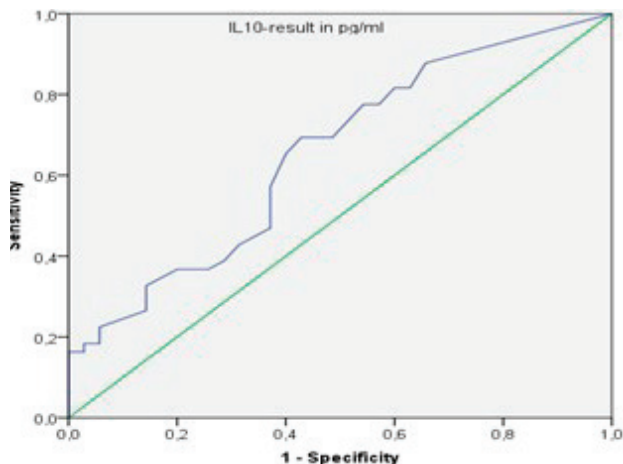
Фиг. 2. Корелация на серумните нива на IL-6 и IL-18 с клинични симптоми при пациентите с ПВ (Spearman's rho): а) корелация на IL-6 с тежестта на симптома умора ($p < 0,01$); б) корелация на IL-6 със степента на загуба на тегло ($p < 0,01$); в) корелация на IL-18 със степента на загуба на тегло ($p < 0,01$)



Фиг. 3. Корелация на серумното ниво на IFN-гамма и стойностите на LDH ($p < 0,05$)

Не бе установена статистически значима зависимост на концентрацията на цитокините от анализирания панел с регистрираните тромботични събития при пациентите с ПВ, както и с размера на слезката, оценен с обрзана диагностика.

С оглед повишените серумни концентрации на считания за антиинфламаторен IL-10 при пациентите с ПВ спрямо здрави контроли и актуалните литературни данни за ролята на дисрегулацията на този цитокин в патогенезата и прогресията на редица неопластични заболявания, бе проведен допълнителен анализ с цел идентифициране на евентуалните му прагови стойности при ПВ [32, 33]. Като минимална прагова стойност бе определена 0.180 pg/ml, верифицирана чрез ROC анализ, при площ под ROC кривата (AUC) от 0.652 [95% конфиденстен интервал (CI): 0,534-0,771], с чувствителност 65.3% и специфичност 60% (фиг. 4).



Фиг. 4. Прагови стойности на IL-10 при ПВ – ROC анализ

ОБСЪЖДАНЕ

Получените резултати дават основание да се предполага потенциална корелация на цитокиновите нива с клиничната изява и еволюцията на миелопролиферативните заболявания и конкретно на ПВ.

Средните серумни концентрации на отделните цитокини, анализирани в двете подгрупи, са сравними със стойностите, регистрирани

в аналогични научни наблюдения, публикувани в световната литература. Настоящото изследване потвърждава, че пациентите с ПВ демонстрират специфичен цитокинов профил в сравнение със здравите контроли.

Множество клинични проучвания в областта на МПН доказаха и утвърдиха мястото на таргетната терапия с JAK2 инхибитори в съвременния подход към ПМФ, а вече и към ПВ. Преимущества на тези терапии по отношение на повлияване на клиничната симптоматика, влошаваща качеството на живот на пациентите, са многократно оценявани и в клинични изпитвания, и в реалната практика, като се счита, че до известна степен ефективността им е базирана на потискане на продукцията на определени цитокини, свързани с патофизиологията на болестта [35, 36].

Свърхекспресията на цитокини при пациентите с ПВ в сравнение със здрави индивиди е обект на интерес и е изследвана и описана в редица научни публикации, докладвани са данни за повишени нива на IL-6, IL-8, IL-11 и на хепатогенния растежен фактор (HGF) [23, 25, 34].

Hermouet и кол. установяват повишени серумни концентрации на IL-8, лептин, HGF и моноцитен хемоатрактантен протеин-1 (MCP-1) при пациенти с ПВ, както и с вторична еритроцитоза спрямо здрави контроли [25]. Gangemi и кол. анализират панел от цитокини, в т.ч. IL-23, IL-10 и IL-22 при групи пациенти с ПВ и ЕТ и потвърждават специфичен цитокинов профил на двете МПН спрямо здрави контроли, със сигнификантна разлика по отношение на IL-23. В рамките на изследването не са доказани корелации с тромботичните усложнения, нито с клиничната изява на симптома сърбеж [26]. Разработките в насока по-прецизно дефиниране на цитокинов панел в бъдещ аспект биха могли да улеснят диагностичните усилия в дефинирането на подтиповете МПН, особено при припокриващи се характеристики, както и да подпомогнат обективността на прогностичните системи и терапевтичните решения.

С оглед на все още непосредствените нужди в лечението на МПН, разширяването на

познанията в областта на инфламаторните процеси при тези заболявания ще позволи таргетиране на цитокиновата сигнализация като път към по-добра терапевтична ефективност. Цитокиновият профил на отделните МПН представлява интерес в насока проследяването му във времето като възможен предиктор на прогресия, както и за проучвания на по-ефективни терапии, тар-

гетиращи както молекулярните пътища на мутациите при МПН, така и механизмите на възпалителния процес.

Разработването на подобни комбинирани лечения би поставило основите на нови възможности за повлияване на симптомите, превенция на прогресията и потенциална промяна на естествения ход на тези заболявания [37-40].

Библиография

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: Integrating morphologic, clinical and genomic data. *Blood* 2022; 140, 1200–1228.
2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2391-405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544.
3. Barbui T, Thiele J, Gisslinger H et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer J*. 2018 Feb 9;8(2):15. doi: 10.1038/s41408-018-0054-y.
4. Moulard O, Mehta J, Fryzek J et al. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. *Eur J Haematol*. 2014 Apr;92(4):289-97. doi: 10.1111/ejh.12256.
5. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005 Apr 28;352(17):1779-90. doi: 10.1056/NEJMoa051113.
6. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013 Dec 19;369(25):2379-90. doi: 10.1056/NEJMoa1311347.
7. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013 Dec 19;369(25):2391-2405. doi: 10.1056/NEJMoa1312542.
8. Pikman Y, Lee BH, Mercher T et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006 Jul;3(7):e270. doi: 10.1371/journal.pmed.0030270.
9. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T et al. MPLW515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006 Nov 15;108(10):3472-6. doi: 10.1182/blood-2006-04-018879.
10. Morsia E, Torre E, Poloni A et al. Molecular Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasms: From Molecular Landscape to Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci*. 2022 Apr 20;23(9):4573. doi: 10.3390/ijms23094573.
11. Skoda RC, Duek A, Grisouard J. Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Exp Hematol*. 2015 Aug;43(8):599-608. doi: 10.1016/j.exphem.2015.06.007.
12. James C, Ugo V, Le Couédic JP et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005 Apr 28;434(7037):1144-8. doi: 10.1038/nature03546.
13. Luque Paz D, Kralovics R, Skoda RC. Genetic basis and molecular profiling in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2023 Apr 20;141(16):1909-1921. doi: 10.1182/blood.2022017578.
14. Rolles B, Mullally A. Molecular Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasms. *Curr Hematol Malig Rep* 17, 319-329 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11899-022-00685-1>
15. Fleischman AG. Inflammation as a Driver of Clonal Evolution in Myeloproliferative Neoplasm. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:606819. doi: 10.1155/2015/606819.
16. Fisher DAC, Fowles JS, Zhou A et al. Inflammatory Pathophysiology as a Contributor to Myeloproliferative Neoplasms. *Front Immunol*. 2021 Jun 1(12):683401. doi: 10.3389/fimmu.2021.683401.
17. Hasselbalch HC, Bjørn ME. MPNs as Inflammatory Diseases: The Evidence, Consequences, and Perspectives. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:102476. doi: 10.1155/2015/102476.
18. Craver BM, El Alaoui K, Scherber RM et al. The Critical Role of Inflammation in the Pathogenesis and Progression of Myeloid Malignancies. *Cancers (Basel)*. 2018 Apr 3;10(4):104. doi: 10.3390/cancers10040104.
19. Hasselbalch HC. Perspectives on chronic inflammation in essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis: is chronic inflammation a trigger and driver of clonal evolution and development of accelerated atherosclerosis and second cancer? *Blood*. 2012 Apr 5;119(14):3219-25. doi: 10.1182/blood-2011-11-394775.
20. Forsey RJ, Thompson JM, Ernerudh J et al. Plasma cytokine profiles in elderly humans. *Mech Ageing Dev*. 2003 Apr;124(4):487-93. doi: 10.1016/s0047-6374(03)00025-3.

21. Hoermann G, Greiner G, Valent P. Cytokine Regulation of Microenvironmental Cells in Myeloproliferative Neoplasms. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:869242. doi: 10.1155/2015/869242.
22. Geyer HL, Dueck AC, Scherber RM et al. Impact of Inflammation on Myeloproliferative Neoplasm Symptom Development. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:284706. doi: 10.1155/2015/284706.
23. Boissinot M, Cleyrat C, Vilaine M et al. Anti-inflammatory cytokines hepatocyte growth factor and interleukin-11 are over-expressed in Polycythemia vera and contribute to the growth of clonal erythroblasts independently of JAK2V617F. *Oncogene.* 2011 Feb 24;30(8):990-1001. doi: 10.1038/onc.2010.479.
24. Pourcelot E, Trocme C, Mondet J et al. Cytokine profiles in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients: clinical implications. *Exp Hematol.* 2014;42(5):360-8. doi: 10.1016/j.exphem.2014.01.006.
25. Hermoue S, Godard A, Pineau D et al. Abnormal production of interleukin (IL)-11 and IL-8 in polycythaemia vera. *Cytokine.* 2002 Nov 24;20(4):178-83. doi: 10.1006/cyto.2002.1994.
26. Gangemi S, Allegra A, Pace E et al. Evaluation of interleukin-23 plasma levels in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Cell Immunol.* 2012 Jul-Aug;278(1-2):91-4. doi: 10.1016/j.cellimm.2012.07.003.
27. Vaidya R, Gangat N, Jimma T et al. Plasma cytokines in polycythemia vera: phenotypic correlates, prognostic relevance, and comparison with myelofibrosis. *Am J Hematol.* 2012 Nov;87(11):1003-5. doi: 10.1002/ajh.23295.
28. Raedler LA. Diagnosis and Management of Polycythemia Vera: Proceedings from a Multidisciplinary Roundtable. *Am Health Drug Benefits.* 2014 Oct;7(7 Suppl 3):S36-47.
29. Tefferi A, Vannucchi AM, Barbui T. Polycythemia vera: historical oversights, diagnostic details, and therapeutic views. *Leukemia.* 2021 Dec;35(12):3339-3351. doi: 10.1038/s41375-021-01401-3.
30. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera: 2024 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2023 Sep;98(9):1465-1487. doi: 10.1002/ajh.27002.
31. Scherber R, Dueck AC, Johansson P et al. The Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form (MPN-SAF): international prospective validation and reliability trial in 402 patients. *Blood.* 2011 Jul 14;118(2):401-8. doi: 10.1182/blood-2011-01-328955.
32. Carlini V, Noonan DM, Abdalalem E et al. The multifaceted nature of IL-10: regulation, role in immunological homeostasis and its relevance to cancer, COVID-19 and post-COVID conditions. *Front Immunol.* 2023 Jun 8;(14):1161067. doi: 10.3389/fimmu.2023.1161067.
33. Mocellin S, Marincola FM, Young HA. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. *J Leukoc Biol.* 2005 Nov;78(5):1043-51. doi: 10.1189/jlb.0705358.
34. Wickenhauser C, Thiele J, Lorenzen J et al. Polycythemia vera megakaryocytes but not megakaryocytes from normal controls and patients with smokers polyglobuly spontaneously express IL-6 and IL-6R and secrete IL-6. *Leukemia.* 1999 Mar;13(3):327-34. doi: 10.1038/sj.leu.2401314.
35. Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med.* 2012 Mar 1;366(9):787-98. doi: 10.1056/NEJMoa1110556.
36. Kiladjian JJ, Winton EF, Talpaz M et al. Ruxolitinib for the treatment of patients with polycythemia vera. *Expert Rev Hematol.* 2015 Aug;8(4):391-401. doi: 10.1586/17474086.2015.1045869.
37. Kleppe M, Koche R, Zou L et al. Dual Targeting of Oncogenic Activation and Inflammatory Signaling Increases Therapeutic Efficacy in Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer Cell.* 2018 Jan 8;33(1):29-43.e7. doi: 10.1016/j.ccell.2017.11.009.
38. Müller P, Baldauf CK, Haage TR et al. Anti-inflammatory treatment in MPN: targeting TNFR1 and TNFR2 in JAK2-V617F-induced disease. *Blood Adv.* 2021 Dec 14;5(23):5349-5359. doi: 10.1182/bloodadvances.2021004438.
39. Jutzi JS, Mullally A. Remodeling the Bone Marrow Microenvironment – A Proposal for Targeting Pro-inflammatory Contributors in MPN. *Front Immunol.* 2020 Aug 31;11:2093. doi: 10.3389/fimmu.2020.02093.
40. Koschmieder S, Mughal TI, Hasselbalch HC et al. Myeloproliferative neoplasms and inflammation: whether to target the malignant clone or the inflammatory process or both. *Leukemia.* 2016 May;30(5):1018-24. doi: 10.1038/leu.2016.12.

Адрес за кореспонденция:*Д-р Гергана Цветкова**e-mail: g.tsvetkova@yahoo.com***Address for correspondence:***Dr. Gergana Tsvetkova**e-mail: g.tsvetkova@yahoo.com*

ПРЕГЛЕД НА СЪВРЕМЕННИТЕ ТЕРАПЕВТИЧНИ ВЪЗМОЖНОСТИ ПРИ ПАРОКСИЗМАЛНА НОЩНА ХЕМОГЛОБИНУРИЯ В БЪЛГАРИЯ

В. Червенков¹, М. Недева², А. Дачева³, Г. Славчев³

¹Новартис България, ²SAT Хелт, ³HTA ООД

Резюме. Пароксизмалната нощна хемоглобинурия (PNH) е рядко, придобито хематологично заболяване, характеризиращо се с комплемент-медирана интраваскуларна хемолиза и тромбоза. Лечението на PNH в исторически план включва симптоматично управление чрез кръвопреливания и антикоагуланти. Въпреки това, след появата на eculizumab през 2007 г., инхибиторите на комплемента, включително и по-новите медикаменти като ravulizumab и pegcetacoplan със значително подобряват клиничните резултати, но тези терапии изискват доживотни инфузии и са свързани със значителни разходи и предизвикателства. Iptacopan – перорален инхибитор на фактор В на алтернативния комплементен път, представлява нова терапевтична възможност за PNH, обещавайки по-удобно приложение и по-добър процес на придържане към терапията. Клиничните данни показват, че iptacopan ефективно редуцира хемолизата, подобрява нивата на хемоглобина и намалява нуждата от кръвопреливания, като същевременно има благоприятен профил на безопасност. Към настоящия момент в България е налична реимбурсирана C5i терапия от първа и втора линия и C3i терапия от втора линия. Целта на тази статия е да представи обзор на актуалните възможности, свързани с грижата за пациентите с PNH в България.

Ключови думи: пароксизмална нощна хемоглобинурия, лечение, iptacopan, инхибитори на комплемента, хемолитична анемия, интраваскуларна хемолиза

REVIEW OF CURRENT TREATMENT OPTIONS FOR PAROXYSMAL NOCTURNAL HEMOGLOBINURIA IN BULGARIA

V. Chervenkov¹, M. Nedeva², A. Dacheva³, G. Slavchev³

¹Novartis Bulgaria, ²SAT Health, ³HTA Ltd. Bulgaria

Abstract. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is a rare, acquired hematologic disorder characterized by complement-mediated intravascular hemolysis and thrombosis. Treatment of PNH has historically involved symptomatic management via blood transfusions and anticoagulants. However, since the introduction of eculizumab in 2007, complement inhibitors, including more recent agents such as ravulizumab, and pegcetacoplan have greatly improved clinical outcomes, but these therapies require lifelong infusions and are associated with significant costs and challenges. Iptacopan – an oral factor B inhibitor of the alternative complement system, represents a new treatment option for PNH, promising more convenient administration and a better adherence process. Clinical data show that iptacopan effectively reduces hemolysis, improves hemoglobin levels, and reduces the need for blood transfusions, while it is well tolerated with an established safety profile. Reimbursed first and second-line therapy with C5 inhibitors and second-line C3 inhibitors is currently available in Bulgaria. This study aims to capture and summarize the current clinical management options of patients with PNH in Bulgaria.

Key words: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, treatment, iptacopan, complement inhibitors, hemolytic anemia, intravascular hemolysis

ВЪВЕДЕНИЕ

Пароксизмалната нощна хемоглобинурия (PNH) е рядко, придобито заболяване на хемопоетичните стволови клетки, което се характеризира с медирана от комплемента вътресъдова хемолиза и тромбоза [1]. Това състояние възниква поради мутации в гена на фосфатидилинозитол гликан А (PIGA), които водят до дефицит на гликозилфосфатидилинозитол (GPI) – протеини, предпазващи еритроцитите от комплементна атака.

Исторически погледнато, лечението на PNH се фокусира върху симптомите и усложненията на заболяването чрез кръвопреливане, антикоагуланти и поддържащи грижи. Появата на eculizumab през 2007 г., инхибиторите на комплемента, включително и по-новите медикаменти като ravulizumab и pegcetacoplan, отбелязва напредък в лечението на PNH, осигурявайки значителни клинични ползи чрез намаляване на хемолизата и тромботичния риск [2]. Тези терапии обаче изискват доживотно инфузионно приложение, което представлява предизвикателство по отношение на необходимостта от придържане към определено поведение на пациентите, реакциите, свързани с инфузията и високите разходи за лечение [3]. Iptacopan е перорален проксимален инхибитор на комплемента, който е насочен към фактор В в алтернативния път и показва подобрени хематологични и клинични резултати при предходно нелекувани и лекувани с инхибитори на C5 пациенти с PNH [4].

Целта на тази статия е да представи обзор на актуалните възможности, свързани с грижата за пациентите с PNH в България.

МЕТОДИ

Този преглед е извършен с помощта на структуриран подход, за да се идентифицират и обобщят настоящите възможности за клинично лечение на PNH в България. Прегледът включва данни от различни източници, включително рецензирана литература, данни от клинични проучвания, национални здравни политики и собствени проучвания, проведени в България.

Извършено е литературно търсене в PubMed и Google Scholar, за да се идентифицират проучвания за лечението на PNH. Прегледани са клинични ръководства, включително тези на Националната здравноосигурителна каса (НЗОК) и Националния рамков договор за медицинските дейности за 2024 г., за да се събере информация за локалните терапевтични възможности.

Включени са проучвания и доклади, изследващи диагностиката, лечението и епидемиологията на PNH, особено тези, които се отнасят за България. Прегледани са и данни от клинични проучвания за инхибитори на комплемента, включително eculizumab, ravulizumab, pegcetacoplan и iptacopan. Освен това са анализирани локални обсервационни данни от хематологични центрове в България. Данните за България се основават на анализ, извършен от CAT Хелт през декември 2023 г.

Основните данни от избраните проучвания са извлечени и обобщени, като се акцентира върху резултатите от лечението, предизвикателствата и достъпността. Използван е качествен синтез, за да се сравнят резултатите от международната литература с локалните български практики, особено в контекста на достъпа до лечение и здравната инфраструктура.

ЕПИДЕМИОЛОГИЯ, СКРИНИНГ И ДИАГНОСТИКА

Честотата на PNH е 15.9/1 000 000 души в световен мащаб, като заболяемостта се оценява на пет до шест нови случая на 1 милион души годишно [5]. Диагностиката и скринингът за PNH са от решаващо значение поради тежкия и животозастрашаващ характер на заболяването [6]. Въпреки че то може да се развие във всяка възраст, обичайно засяга жени на възраст 20–40 г., а водещият симптом е умората [7]. Клиничната картина включва още хемоглобинурия, анемия, коремна болка и тежки тромботични събития, които могат значително да влошат качеството на живот и да увеличат риска от смърт [1]. Въпреки лесните възможности за диагностициране, понякога заболяването може да се пропусне, тъй като клиничната изява е неспецифична, а честотата е много ниска.

Собствено проучване, извършено от „САТ Хелт“ АД, показва, че PNH лесно се диагностицира в университетските клиники по хематология, но поради фокус на различни специалисти върху желязодефицитните анемии понякога се забавя насочването на пациентите към хематолог, който може да установи хемолитичната анемия, характерна за PNH [8]. Проучването е проведено чрез задълбочени качествени интервюта сред целеви групи хематолози в България.

Диагностиката на PNH се извършва по реда на Амбулаторна процедура № 27 (част от действащ към 2024 г. Национален рамков договор за медицински дейности), следвайки ясно определени стъпки, включително първоначални лабораторни изследвания, които обикновено показват анемия, повишени стойности на лактатдехидрогеназа (LDH), билирубин и ретикулоцити, както и понижени нива на хаптоглобин. След това за потвърждаване на диагнозата се използва флуоцитометрия. В някои случаи може да се извършат аспирация и биопсия на костен мозък.

Флуоцитометрията е златен стандарт за диагностиката на PNH, като използва флуоресцентно маркирани моноклонални антитела (CD55 и CD59) в периферна кръв и нивата на други GPI-свързани протеини като CD16 и други [1, 9]. Въпреки че аспирацията и биопсията на костен мозък не се изискват изрично за диагностициране на PNH, те са силно препоръчани за оценка на евентуално наличие на костномозъчна недостатъчност вследствие на миелодиспластични синдроми, апластична анемия или идиопатична миелофиброза. Реактивите за CD55 и CD59 обаче са скъпи и могат да не бъдат използвани в рамките на срока им на годност, тъй като диагностичните тестове се извършват рядко. Пациентите с PNH могат да получат медицинска помощ, заплатена от НЗОК, по няколко направления с код по МКБ D59.5¹:

- КП 244.1 – при трансфузия;
 - КП 245 – при трансфузия на онкологични пациенти;
 - АП 27 – флуоцитометрия (основно в СБАЛХЗ² и Токуда³);
 - АП 6 – инфузия на моноклонални антитела.
- Ниската честота на заболяването поставя диагностични трудности [8]. Така например общопрактикуващите лекари и специалисти в редица случаи не насочват пациентите с анемия директно към хематолог [8]. В тази връзка обучението в интердисциплинарни семинари може да увеличи диагностиката на заболяването с акцент върху изследване на билирубин и LDH като маркери за хемолитична анемия [10]. Мониторингът също крие трудности, тъй като някои пациенти без значими оплаквания при по-ниски нива на хемоглобин се успокояват от бенигния характер на заболяването и не спазват стриктно клиничните посещения при хематолог, подценявайки високия риск от съдови събития като тромбози и инсулт.

ЛЕЧЕНИЕ

Липсата на два GPI-свързани протеина, CD55 и CD59, води до неконтролирано активиране на комплемента, асоциирано с хемолиза и други PNH прояви като интраваскуларна хемолитична анемия, тромбоза, гладкомускулна дистония, сериозни инфекции и панцитопения [1]. В тази връзка основното лечение при класическа PNH е постигане на ремисия с липса на тромбоза и хемолиза [11]. Лечението при другите два типа аутоимунна PNH (PNH, свързана с костномозъчно заболяване и субклинична PNH) се фокусира върху отношението риск/полза, свързано с алогенна хемопоетична трансплантация на стволови клетки и/или бъбречна трансплантация [12]. Лечението на PNH включва симптоматично лечение, алогенна трансплантация на стволови клетки (HCT) и инхибитори на комплемента.

¹Посочените условия на предоставяне на медицинска помощ, документи и тяхната номерация са актуални съгласно действащия към момента на публикуване на статията Национален рамков договор за медицински дейности.

²Специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания ЕАД

³Аджибадем сити клиник университетска многопрофилна болница за активно лечение Токуда ЕАД

Симптоматичното лечение включва желязни препарати, фолати и витамин В12, хемотрансфузии, антибиотично лечение на бактериалните инфекции, кратки кортикостероидни курсове за намаляване на хемолитичните кризи, имunosупресия при пациенти с придружаваща апластична анемия или костномозъчна недостатъчност и антикоагулантна профилактика за предотвратяване на тромботичните събития.

Алогенната трансплантация на стволови клетки е потенциално дефинитивно лечение, запазено за пациентите с тежка PNH със значими придружаващи заболявания, висок риск от фатален изход и без отговор от други терапии. НСТ е свързана с висок риск от посттрансплантационна инфекция и смърт и трябва да се обмисли внимателно [13].

Инхибиторите на C5 (C5i) като eculizumab и ravulizumab водят до значими подобрения в лечението на PNH, смъртността и тежестта, както и свързаното със здравето качество на живот на пациентите с това заболяване [14]. В различни проучвания обаче се съобщава, че до 89,5% и 88,6% от пациентите съотв. остават анемични и изпитват умора по време на лечението с C5i [15-17]. Освен това до 52,2% от пациентите на терапия с C5i все още се нуждаят от хемотрансфузии [15]. C5i (eculizumab и ravulizumab) контролират интраваскуларната хемолиза, докато C3i (pegcetacoplan) допълнително притежават потенциал да контролират екстраваскуларната комплемент-медирана хемолиза поради инхибиране на C3, което е на по-високо ниво от C5 в комплемент-активиращата система [18, 19].

Употребата на C3i при PNH представлява значителен напредък в лечението на това състояние, особено при пациенти, които не отговарят напълно на C5 инхибитори като eculizumab. В проучването PEGASUS pegcetacoplan превъзхожда eculizumab по отношение на подобряването на хемоглобина и клиничните, и хематологичните резултати при пациенти с PNH, като осигурява широк контрол на хемолизата, включително кон-

трол на интраваскуларната и екстраваскуларната хемолиза [20]. В друго проучване се подчертава, че често срещаните варианти в комплементните протеини C3 и CR1 могат да увеличат атаката на комплемента върху еритроцитите при PNH, което предполага, че тези полиморфизми могат да повлияят ефикасността на инхибиторите на комплемента и да повлияят риска от екстраваскуларна хемолиза [21].

Проучването COMMODORE 3 показва, че civalimab, нов инхибитор на C5, ефективно контролира хемолизата и намалява необходимостта от трансфузии при пациенти с PNH без предходно лечение с инхибитори на комплемента [22]. В допълнение, проучване върху лечението с eculizumab показва, че свързването на C3 с еритроцитите при PNH, се осъществява стохастично, което допринася за екстраваскуларната хемолиза и предполага необходимостта от комбинирано инхибиране на C3 и C5 за подобряване на терапевтичните резултати [23].

Iptacopan представлява нов терапевтичен подход при PNH. Като перорален, селективен инхибитор на фактор В на алтернативния път на комплемента, iptacopan предлага потенциал за по-удобно приложение и по-добро придържане към терапията на пациентите. Действието му над C5 терминалния път предотвратява не само интраваскуларната, но и екстраваскуларната хемолиза. В допълнение, медикаментът се проучва при редица други комплемент-медиранни заболявания като C3 гломерулопатия, IgA нефропатия, атипичен хемолитично-уремичен синдром и лупусен нефрит. Клиничните данни показват обещаващи резултати по отношение на ефикасността и безопасността, което предполага, че iptacopan може да преодолее някои от ограниченията, свързани с настоящото лечение на PNH [4].

Две големи рандомизирани, фаза 3 проучвания изследват iptacopan при PNH. Клиничното проучване APPLY-PNH (NCT04558918) постига и двете си първични крайни точки [4]. Iptacopan статистически значимо превъзхож-

да C5i терапията с терапевтична разлика от 80,2% за крайната точка „хематологичен респондер“, определена като постигане на трайно повишение на нивата на хемоглобин (Hb) спрямо изходното ниво от ≥ 2 g/dL при липса на трансфузии на еритроцити ($p < 0,0001$), и 67,0% за хематологичната крайна точка, определена като постигане на устойчиви нива на Hb ≥ 12 g/dL при липса на трансфузии на еритроцити ($p < 0,0001$). В допълнение, ipatasoran статистически значимо превъзхожда C5i терапията с разлика на честотата на пациентите без кръвопреливане между 14-ия и 168-ия ден от 68,9% ($p < 0,0001$), както и по отношение на промяната спрямо изходното ниво на Hb с коригирана средна разлика от +3,66 g/dL ($P < 0,0001$). Клиничното проучване APPOINT-PNH (NCT04820530) също постига своята първична цел за първичната крайна точка „хематологичен отговор“ [4]. Делът на пациентите, постигнали подобрене на Hb ≥ 2 g/dL спрямо изходното ниво без трансфузия на еритроцити, е 92,2%. Честотата на пациентите, които постигат нива на хемоглобин ≥ 12 g/dL при липса на трансфузия на еритроцити, е 62,8%, а 97,6% от пациентите са без кръвопреливане между 14-ия и 168-ия ден [4].

ТЕРАПЕВТИЧНИ ВЪЗМОЖНОСТИ В БЪЛГАРИЯ

В България се лекуват около 5 пациенти с PNH всяка година (2 пациенти за 2023 г., 5 пациенти за 2022 г., 6 пациенти за 2021 г., 5 пациенти за 2020 г.). Някои пациенти не провеждат лечение по тяхно желание, други използват възможностите за лечение по реда на чл. 9 от Закона за лекарствените продукти в хуманната медицина, а част от пациентите получават лечението и неговото заплащане чрез Националната здравноосигурителна каса при условията и реда, определени със Закона за здравето и предвидената от него Наредба № 2 от 27 март 2019 г. за медицинските и други услуги по чл. 82, ал. 1а и 3 от Закона за здравето и за реда и условията за

тяхното одобряване, ползване и заплащане (Наредба № 2).

Лекарственият продукт pegcetacoplan е включен в Позитивен лекарствен списък и се заплаща от Националната здравноосигурителна каса от 1.01.2023 г. Съгласно ограниченията за предписване и Изисквания на НЗОК при лечение на пароксизмална нощна хемоглобинурия в извънболничната помощ (обнародвани в ДВ, бр. 46 от 31.05.2024 г.) през първото тримесечие на 2024 г. НЗОК е заплатила общо 64 опаковки от продукта на стойност 421 793,92 лева⁴.

Около половината от свързаните с анемия хоспитализации по КП 244.1 за 2022 г. са съсредоточени в 6 лечебни заведения в България (14% в Специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания ЕАД, 10% в Многопрофилна болница за активно лечение, „Св. София“ ЕООД, 8% в Университетска многопрофилна болница за активно лечение „Св. Иван Рилски“ ЕАД, 7% в Университетска многопрофилна болница за активно лечение „Св. Георги“ ЕАД, 6% в Университетска многопрофилна болница за активно лечение „Св. Марина“ ЕАД и 4% в Университетска многопрофилна болница за активно лечение – Бургас АД).

През 2023 г. в България са извършени над 50 трансплантации на стволови клетки, което е повече в сравнение с 2022 г. и 2021 г. (по 43 трансплантации). Те са извършени в три лечебни заведения в България⁵ – Специализирана болница за активно лечение на хематологични заболявания ЕАД, Университетска многопрофилна болница за активно лечение „Св. Марина“ ЕАД и Университетска многопрофилна болница за активно лечение „Св. Георги“ ЕАД.

Към настоящия момент, C5 инхибиторите eculizumab и ravulizumab са реимбурсирани

⁴Справка за brutните разходи на НЗОК за 1-во тримесечие на 2024 г. за отпуснати / приложени и отчетени количества от лекарствения продукт pegcetacoplan.

⁵МЗ; Изпълнителна агенция „Медицински надзор“

като първа линия на терапия, а *ravulizumab* може да се използва и като втора линия на терапия след неуспех от терапия с *eculizumab*. *Pecacetacoplan* е единственият реимбурсиран C3i за пациенти с PNH в България за лечение от втора линия след неуспех от C5i лечение. Локалните наблюдения на хематолози върху лечението с C5i и C3i показват, че C3i водят до по-бързо покачване на нивата на хемоглобина при сходен и много добър профил на безопасност и за двете групи лекарствени продукти [8].

Осигуряването на част от лечението при условията за внос на лекарствени продукти по реда на Наредба № 10 от 17 ноември 2011 г. за условията и реда за лечение с неразрешени за употреба в Република България лекарствени продукти, лекарствени продукти, прилагани извън условията на разрешението за употреба, и лекарствени продукти за състрадателна употреба, както и за условията и реда за включване, промени, изключване и доставка на лекарствени продукти от списъка по чл. 266а, ал. 2 от Закона за лекарствени продукти в хуманната медицина крие трудности във връзка с необходимостта от намирането на доставчик за лекарствени продукти, а протоколите за лечение, съставени по специална комисия се съгласуват с Изпълнителна агенция по лекарствата, която от своя страна информира лицата, които ще осъществят доставката на лекарствения продукт, или прави мотивиран отказ за тази доставка. Допълнително ограничение в използването на описания ред за достъп е в случаите, когато не е възможно финансиране от НЗОК, разходът за лекарствени продукти е за лечебното заведение или за пациента, който трябва да възстанови съответния разход на лечебното заведение. Не на последно място ограничение в употребата на C3i/C5i е и фактът, че доставката и лечението на този етап могат да се извършат само от лечебно заведение за болнична помощ.

Пероралните лекарствени продукти за поддържащи грижи като кортикостероиди, жлезни препарати, други имуносупресори съ-

що не се заплащат с публични средства в извънболничната помощ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Въпреки наличието на терапии като *eculizumab* и *ravulizumab* PNH остава сериозно и животозастрашаващо заболяване, което изисква внимателна и навременна диагностика и непрекъснато лечение. Традиционните методи за лечение, включващи кръвопреливания и антикоагуланти, са значително допълнени през последните две десетилетия от терапии като инхибитори на комплемента. Регистрираният преди 17 години *eculizumab*, заедно с по-новите препарати *ravulizumab* и *pecacetacoplan*, значително подобряват клиничните резултати при пациентите с PNH. Въпреки това тези терапии имат своите ограничения, свързани с инфузионното приложение и непълното потискане на комплемента. *Iptacoplan* представлява значителен напредък в лечението на PNH, предлагайки перорален подход за инхибиране на фактор В на алтернативния път на комплемента. Тези обещаващи резултати от клиничните проучвания предполагат, че *iptacoplan* може да преодолее някои от ограниченията на настоящите терапии като инфузионното приложение и непълното инхибиране на комплемента и да предложи перорална възможност за лечение, която намалява хемолизата, подобрява нивата на хемоглобин и намалява нуждата от кръвопреливане при пациенти с PNH, като същевременно се понася добре и има добър профил на безопасност.

В България лечението на PNH се осъществява в ограничен брой центрове, разположени в няколко ключови лечебни заведения. Въпреки че се наблюдава напредък в скрининга и диагностиката на заболяването, остава необходимостта от допълнително обучение на медицинските специалисти и информиране на пациентите за значимостта на редовното проследяване, включително възприемане на ключови практики като рутинно измерване на хемоглобина и осигуряване на адекватно лечение за оптимизиране на пациентските резултати.

Библиография

1. Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2014;124(18):2804-11.
2. Hill A, Richards SJ, Hillmen P. Recent developments in the understanding and management of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol*. 2007;137(3):181-92.
3. Broderick KC, Burke JP, Fishman J, Gleason PP. Descriptive, real-world treatment patterns, resource use, and total cost of care among eculizumab- and ravulizumab-treated members with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Manag Care Spec Pharm*. 2023;29(8):941-951.
4. Peffault de Latour R, Röth A, Kulasekararaj AG, et al. Oral Iptacopan Monotherapy in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2024;390(11):994-1008.
5. Farooq Q, Saleem MW, Khan ZU, Hadi N. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a diagnostic “zero-sum-game”. *Cureus* 2020;12(12):e11956.
6. Devalet B, Mullier F, Chatelain B, et al. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a review. *Eur J Haematol*. 2015 Sep;95(3):190-8. doi: 10.1111/ejh.12543.
7. Shah N, Bhatt H. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. [Updated 2023 Jul 31]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562292/>
8. Exploring potential and treatment landscape for Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) in Bulgaria. Analysis by SAT Health, Dec 2023. Data on file.
9. Shah N, Bhatt H. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. In: StatPearls. StatPearls Publishing; 2023. Last updated: July 31, 2023. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562292/>
10. Cançado RD, Araújo ADS, Sandes AF, et al. Consensus statement for diagnosis and treatment of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Hematol Transfus Cell Ther*. 2021;43(3):341-8.
11. Risitano AM, Rotoli B. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: pathophysiology, natural history and treatment options in the era of biological agents. *Biologics*. 2008;2(2):205-22.
12. Sahin U, Toprak SK, Atilla PA, et al. An overview of infectious complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Chemother*. 2016 Aug;22(8):505-14. doi: 10.1016/j.jiac.2016.05.006.
13. Dingli D, Matos JE, Lehrhaupt K, et al. The burden of illness in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria receiving treatment with the C5-inhibitors eculizumab or ravulizumab: results from a US patient survey. *Ann Hematol* 2022;101(2):251-63.
14. Bektas M, Copley-Merriman C, Khan S, et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: current treatments and unmet needs. *J Manag Care Spec Pharm*. 2020;26(12-b Suppl):S14-S20.
15. Panse J, Sicre de Fontbrune F, Burmester P, et al. The burden of illness of patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria receiving C5 inhibitors in France, Germany and the United Kingdom: Patient-reported insights on symptoms and quality of life. *Eur J Haematol* 2022;109(4):351-63.
16. Sicre de Fontbrune F, Burmester P, Piggin M, et al. The burden of illness of patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria receiving C5 inhibitors: clinical outcomes and medical encounters from the patient perspective. *Hematology* 2022;27(1):1140-51.
17. DeZem AE, Dorr D, Brodsky RA. Predictors of hemoglobin response to eculizumab therapy in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Eur J Haematol* 2013;90(1):16-24.
18. Debureau PE, Cacace F, Silva BGP, et al. Hematological response to eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: application of a novel classification to identify unmet clinical needs and future clinical goals [abstract]. *Blood* 2019;134(Suppl 1):3517.
19. Fattizzo B, Versino F, Zaninoni A, et al. Case report: Transfusion independence and abolition of extravascular hemolysis in a PNH patient treated with pegcetacoplan. *Front Immunol* 2022;13:1060923.
20. Hillmen P, Szer J, Weitz I, et al. Pegcetacoplan versus Eculizumab in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *N Engl J Med*. 2021;384(11):1028-1037. doi: 10.1056/NEJMoa2029073. Erratum in: *N Engl J Med*. 2024;390(11):1060.
21. Baral AJ. The impact of common variants in C3 and CR1 on C3-mediated extravascular haemolysis in Paroxysmal Nocturnal Haemoglobinuria (Doctoral dissertation, Newcastle University). 2023. Newcastle University eTheses. <http://theses.ncl.ac.uk/jspui/handle/10443/5998>
22. Liu H, Xia L, Weng J, et al. Efficacy and safety of the C5 inhibitor crovalimab in complement inhibitor-naive patients with PNH (COM-MODORE 3): A multicenter, Phase 3, single-arm study. *Am J Hematol* 2023;98(9):1407-14.
23. Sica M, Rondelli T, Ricci P et al. Eculizumab treatment: stochastic occurrence of C3 binding to individual PNH erythrocytes. *J Hematol Oncol* 2017;10(1):126.

Адрес за кореспонденция:

Витан Червенков

e-mail: vitan.chervenkov@novartis.com

Address for correspondence:

Vitan Chervenkov

e-mail: vitan.chervenkov@novartis.com

ТЪКАННО ИНЖЕНЕРСТВО, БАЗИРАНО НА СТВОЛОВИ КЛЕТКИ И РАЗЛИЧНИ БИОТЕХНОЛОГИЧНИ МЕТОДИ

Т. Веков, Г. Димитров, Т. Самарджиев, Б. Борисов

МБАЛ „Сърце и мозък“ – Плевен

Резюме. Тъканното инженерство включва регенерация и възстановяване на различни видове тъкани чрез прилагане на множество биоинженерни подходи за подобряване на диференциацията и увеличаване на преживяемостта на стволовите клетки след тяхното трансплантиране. Проектираните биоматериални матрици, използвани в тканното инженерство, трябва да имат силен функционален и структурен афинитет към целевите тъкани и клетъчни типове, за да стимулират правилно регенерацията на тъканите. В обзора са разгледани разработените естествени и синтетични биоматериали за възстановяване на структурата и функцията на уверени тъкани като кости, хрущяли, нервни тъкани, трахея, кожа, скелетни мускули и кръвоносни съдове. Базираните на наноматериали терапевтични подходи са проектирани с помощта на различни биоразградими и биосъвместими наноносители или нановлакна за насърчаване на диференциацията на стволовите клетки и постигане на терапевтичните резултати.

Ключови думи: тканно инженерство, стволови клетки, биотехнологии, биоинженерни подходи

STEM-CELL-BASED TISSUE ENGINEERING AND VARIED BIOTECHNOLOGICAL METHODS

T. Vekov, G. Dimitrov, T. Semerdzhiev, B. Borisov

Multiprofile Hospital for Active Treatment Heart and Brain – Pleven

Abstract. Tissue engineering includes regeneration and recovery of different tissue types through the administration of multiple bioengineering approaches for improvement of differentiation and lengthening of survival of stem cells after their transplantation. To stimulate tissue regeneration correctly, designed biomaterial scaffolds used in tissue engineering need to have a high functional and structural affinity with target tissues and cell types. In the review, the developed natural and synthetic biomaterials for recovery of the structures and functions of injured tissues such as bones, cartilages, nerve tissues, trachea, skin, skeletal muscles and blood vessels, are discussed. Nanomaterial-based therapeutic approaches are designed using different biodegradable and biocompatible nanocarriers or nanofibers for promoting stem cell differentiation and achievement of therapeutic outcomes.

Key words: tissue engineering, stem cells, biotechnologies, bioengineering approaches

ВЪВЕДЕНИЕ

Тъканното инженерство представлява регенерация и възстановяване на различни видове тъкани чрез прилагане на множество биоинженерни подходи за подобряване на диференциацията и увеличаване на преживяемостта на стволовите клетки след тяхното трансплантиране. Инженерните подходи, базирани на биоматериална матрица, са пред-

назначени основно за имплантиране на жизнеспособни целеви клетки в порест 3D скелет и сигнални молекули или растежни фактори за осигуряване на тъканна архитектура за клетъчна инфилтрация и пролиферация с цел възстановяване и регенерация на увредена тъкан [1].

Например комбинацията от няколко биоразградими 3D матрици и трансплантирани

стволови клетки е атрактивна терапевтична стратегия за регенерация на увредени тъкани чрез улесняване на клетъчното оцеляване и задържане [2].

Съвременната стратегия за използване на 3D пореста или влакнестта матрица от биоматериали, може да преодолее ограниченията пред терапиите със стволови клетки (SC) чрез подпомагане на адхезията, оцеляването, пролиферацията и диференциацията на SC, като същевременно осигурява приемлива 3D тъканна микросреда. Матрицата може да бъде базирана на естествени или синтетични биоматериали, като осигурява различни химични сигнали и механични опори за трансплантираните стволови клетки на специфични места в увредените тъкани [3].

Хидратираните и микропорести хидрогелове (клас Биоматериални матрици), осигуряват идеална 3D микросреда за стабилно капсулиране на стволови клетки заедно със сигнални молекули, пептиди или растежни фактори [4]. Хидрогеловите, структурирани от различни естествени полимери като колаген, алгинати, желатин и хиалуоронова киселина, служат като имунологични бариери за защита на имплантираните стволови клетки от имунната атака на гостоприемника, като същевременно поддържат пропускливост за сигнални молекули или растежни фактори [5].

Различните клетки и тъкани имат свой специфичен химичен състав и физични характеристики. Следователно проектираните биоматериални матрици, използвани в тъканното инженерство, трябва да имат силен функционален и структурен афинитет към целевите тъкани и клетъчни типове, за да стимулират правилно регенерацията на тъканите [6]. Структурните и механичните свойства на повърхността на биоматериала като електрически заряд, химичен състав и хидрофобност могат да играят ключова роля в регулирането на техните разнообразни биологични функции. Терапевтичните ефекти до голяма степен зависят от реципрочните взаимодействия между трансплантираните биоматериали със специфичните си структурни

и механични характеристики и 3D микросредата на специфичните тъкани.

Различни синтетични или естествени матрици, базирани на биоматериали, могат да осигурят дългосрочна и ефективна клетъчна микросреда за задържане на трансплантираните SC и за увеличаване на степента на преживяемост в увредените тъкани, като повишават техния терапевтичен потенциал след приложение [7].

Не на последно място, трябва да се отбележи, че трансплантираните матрици от биоматериали за нуждите на тъканното инженерство значително намаляват фиброзата и отлагането на колаген, като същевременно намаляват възпалението и индуцираната апоптоза [8].

В публикацията е направен аналитичен преглед на разработените естествени и синтетични биоматериали за възстановяване на структурата и функцията на увредени тъкани като кости, хрущяли, нервни тъкани, трахея, кожа, скелетни мускули и кръвоносни съдове. Анализирани са публикувани научни данни от предклинични и клинични изпитвания на конструкции от матрици, базирани на биоматериали и стволови клетки, с цел тъканно инженерство и регенерация на тъкани и органи.

Регенериране и възстановяване на кожни рани

Прилагането на технологии, базирани на SC, при заздравяване на рани и регенерация на кожата се е увеличило значително през последното десетилетие. Няколко отделни популации от SC са идентифицирани и характеризирани в епидермиса с различни местоположения и функции, притежаващи силни способности за възстановяване и регенерация на кожата [9].

Най-често за регенерация на кожата се използват LGR6+ епидермални стволови клетки или мезенхимни стволови клетки (MSC), получени от различни тъкани [10].

MSC, трансплантирани в кожни рани, значително ускоряват заздравяването с усилена повторна епителизация, васкуларизация и

диференциация в епителни клетки и кератиноцити [11]. Друг пример е с произведени от костен мозък MSC, култивирани в колаген-хитозанова матрица, притежаваща механични свойства, подобни на тези на меките тъкани, които значително подобряват степента на отлагане на колаген и скоростта на зарастване на рани [12].

Друг екип изследователи също демонстрира, че BM-MSC, култивирани върху синтетичен полисилоксанова полимерна матрица, до голяма степен подобряват кожните рани, засилват реепителизацията, отлагането на колаген и насърчават васкуларизацията и растежа на кожата в местата на имплантиране чрез освобождаване на различни паракринни фактори и/или набиране на ендогенни прогениторни клетки [13].

Изследване установява, че MSC, произведени от мастна тъкан (AD-MSC) или секретом, значително подобряват лечебния процес в ранна фаза чрез увеличаване на миграцията и пролиферацията на дермалните фибробласти и инхибиране на възпалителния отговор [14]. Тези интракутанно инжектирани AD-MSC в дермалните и подкожните слоеве могат да оцелеят *in vivo* до една година в имунодефицитни мишки и да се диференцират в адипоцити, за да осигурят подходяща архитектура и микросреда за повторна епителизация и последващо дермално възстановяване. Освен това AD-MSC, имплантирани в заредена с куркумин колагенова матрица, значително ускоряват процеса на заздравяване на язви [15].

Постиженията на тъканното и генното инженерство са видими и при лечението на някои генетични заболявания, като булозна епидермолиза (EB). С клинични изпитвания е установено, че локалното имплантиране на генномодифицирани епидермални стволови клетки може да регенерира функционален епидермален слой, което води до трайно зарастване на хронични рани от EB [16]. В този контекст разработването на нови биоматериали е много важно за доставянето на терапевтични трансгени до целевите клетки,

които постоянно участват в регенерацията на динамичната епидермална тъкан.

Комплексното приложение на постиженията на генното и тъканното инженерство са проучени в редица предклинични и клинични изпитвания за възстановяване и регенерация на кожа. Едно от тях изследва приложението на положително заредени поликатионни молекули като полибрен за повишаване *in vivo* на ефективността на доставяне на ген чрез ретровирусна трансдукция в кератиноцити и дермални фибробласти [17].

Костна регенерация и възстановяване

Използването на базирани на биоматериали матрици за локално доставяне на стволови клетки в областта на костни дефекти значително намалява потенциалния риск от ектопично костно образуване. 3D структурата на такава биоинженерна матрица, която имитира естествената костна микросреда, улеснява клетъчната адхезия, растеж и диференциация [18].

Добър клетъчен източник за костно биоинженерство са MSC, които имат висок потенциал да се диференцират в костообразуващи остеобласти, за да произведат костна матрица, и в хондроцити, които впоследствие претърпяват минерализация и резорбция при имплантиране.

Интегрирането на MSC върху биоинженерна матрица се осъществява чрез няколко технологии. Първата включва директно посяване на AD-MSC върху предварително произведена матрица от 3D копринен фиброин (SF) с относително висока клетъчна жизнеспособност и повишена пролиферация [19]. Вторият подход представлява едновременно включване на SC и биоматериала в матрица, базирана на наноглина, по време на производството [20]. Трети описан подход включва изработването на трислойна матрица, в която BM-MSC са едновременно интегрирани с желатинов метакрилен хидрогел (GelMA) чрез използване на UV светлинно подпомаган поэтапен метод за инфилтрация и омрежване [21].

Регенерация на гръбначен мозък или периферен нерв

Една от най-често използваните матрици е базирана на хитозан, комбиниран с невротрофин-3 (NT-3), който засилва жизнеспособността и диференциацията на нервните стволкови клетки в неврони. Хитозановите носители показват добра биосъвместимост с невралните стволкови клетки и значително насърчават тяхната диференциация, включително в холинергични и GABA-ергични неврони [22].

Друга потенциална матрица за невронно тъканно инженерство е базирана на колаген. Този протеин присъства в пролиферативните региони по време на неврогенезата и потиска пролиферацията и диференциацията на глиалните клетки, като същевременно увеличава диференциацията на невронните прогениторни клетки. Колагенова матрица, засята с ембрионални неврални стволкови клетки, може да се използва за ефективна трансплантация и защита на имплантираните клетки, като засилва невралната диференциация и води до значително подобрени терапевтични ефекти в миши модел [23].

Друга приложима матрица е триизмерният биоразградим порест скелет с хиалуронова киселина. Трансплантирането на невронни стволкови клетки с хиалуронов хидрогел в гръбначен мозък на плъх индуцира диференциацията на SC в астроцити, неврони и олигодендроцити, което води до повишена невронна миелинизация [24].

Пореден пример е използването на скелет, съдържащ комбинация от фибрин с взаимопрониक्ващи мрежи от хиалуронова киселина и ламинин, което значително насърчава растежа и диференциацията на човешки неврални/прогениторни клетки, като същевременно намалява клетъчномедираното разграждане. В допълнение, след добавяне на катехол-функционализиран хидрогел диференцираните стволкови/прогениторни клетки демонстрират повишена електрофизиологична функционалност [25].

Регенерация и възстановяване на васкуларизирана тъкан

Различни технологии за тъканно инженерство, базирани на биоматериали, са предложени като алтернативни терапевтични стратегии за преодоляване на ограниченията в текущото лечение на сърдечно-съдови заболявания. Основната стратегия на тези биоинженерни технологии се базира на директно трансплантиране на васкуларизирани миметици на сърдечна тъкан, които са произведени в съответствие със специфичната тъканна микросреда на целевите места.

Изборът на подходящ клетъчен източник, отразяващ тъканноспецифичните характеристики, също е важен за разработването на функционални сърдечни или съдови тъканни миметици, за да се осигурят структурна стабилност и точно включване в увредените места [26]. MSC от костен мозък или мастна тъкан са привлекателен източник на васкуларни клетки за тъканно биоинженерство. Установен е повишен потенциал за диференциация на AD-MSC във функционални контрактилни гладкомускулни клетки след капсулиране с базиран на биоматериал хидрогел и пролиферация върху децелуларизиран скелет на кръвоносен съд, което предполага техния капацитет за регенериране на съдовите структури и функции [27].

Друг обещаващ клетъчен източник е BM-MSC за възстановяване на увреден миокард след инфаркт, поради потенциала за диференциация във функционални кардиомиоцити и секреция на паракринни фактори. Посяването на пореста колагенова матрица с BM-MSC и нейното трансформиране подобряват миокардната функция чрез увеличаване на секрецията на трофичен фактор и регулиране на имуномодулаторната функция [28].

Подходящ клетъчен източник са и MSC от пъпна връв (UCB-MSC), които се характеризират с относително ниска имуногенност, висок пролиферативен потенциал *in vitro* и са ефективни при трансплантиране на пациенти с миокарден инфаркт. UCB-MSC показват способ-

ност за самоорганизация в матригел-медиранни клетъчни мрежи и активирани ангиогенни миелоидни клетки. UCB-MSC матригелът индуцира образуването на нова функционална микроваскулатура, която е свързана със съдовата система на гостоприемника в животински модел на остър миокарден инфаркт [29].

Ендотелните прогениторни клетки (EPC) са подходящ източник за регенериране и възстановяване на увредени кръвоносни съдове. Те се характеризират с повишена диференциация във функционални ендотелни клетки, като ендотелната регенерация се реализира чрез ангиогенеза и повторна ендотелизация. EPC могат да бъдат посети върху децелуларизиран скелет на кръвоносен съд. Тъканноинженерните малки кръвоносни съдове демонстрират контракталитет и индуцирано от азотен окис съдово свиване/отпускане, подобно на естествените сърдечни артерии [30]. По-късно е разработена хитозан-желатинова матрица, която е посята с CD34+ EPC и ефективно стимулира повторното ендотелизиране на трансплантираните EPC [31].

Регенерация на трахеална тъкан чрез биоинженерство на стволови клетки

Настоящите терапевтични подходи за възстановяване и регенерация на трахеята включват безклетъчни 3D тъканни миметици, автоложни тъкани и децелуларизирани автоложни тъкани, които запазват естествената структура на органа и се рецелуларизират от клетките, получени от реципиента. Въпреки голямото разнообразие от терапевтични стратегии, тези подходи са ограничени от недостатъчна механична якост и морфологични промени по време на и след трансплантация, които могат да причинят стесняване или блокиране на дихателните пътища [32].

Понастоящем като оптимална матрица се използва децелуларизирана трахея поради повишената си проангиогенна активност, отлична биосъвместимост и оригинална структура. Такава матрица е разработена с васкуляризиран BM-MSC сегмент, който демонстрира силен ангиогенен потенциал [33].

Използването на трахеална матрица значително повишава ефективността на клетъчното прикрепване в допълнение към осигуряването на хомогенно разпределение на клетките в нея. Освен това тъканноинженерната трахея насърчава хондрогенезата на BM-MSC и образуването на хомогенен неохрущял *in vivo* [34].

По-скорошно изследване установява, че покритата с хиалуронова киселина поликапролактонова матрица демонстрира по-добри нива на адхезия на MSC и по-голяма регенерация на лигавицата в сравнение с матрица без покритие [35]. Разработени са също биомиметични трахеи, базирани на ателоколаген с инкорпориран хондроитин сулфат, които показват значителен хондрогенен потенциал, използвайки BM-MSC за улесняване образуването на васкуляризирана фиброзна тъкан, имитираща структурата и функцията на трахеята. Тези биомиметични трахеи демонстрират успешна трахеална реконструкция и задоволителни терапевтични резултати *in vivo* [36].

Друга стратегия включва изработването на изкуствена трахея, без да се използва матрица, а технология за био-3D принтиране със сфероиди, съдържащи различни видове автоложни клетки, като MSC, хондроцити и ендотелни клетки. Тези био-3D принтирани трахеи показват достатъчна здравина, за да бъдат трансплантирани, като поддържат хондрогенезата и васкулогенезата *in vivo* [37].

Регенерация на тъканите на репродуктивната система

Една от най-обещаващите стратегии за регенериране на увреден ендометриум е прилагането на технологии за тъканно инженерство, базирани на ендометриална матрица. Използването на колагенов скелет, засят с човешки UCB-MSC, насърчава регенерацията на ендометриума и възстановяването на плодовитостта чрез потенциране на ремоделирането на колаген, вътрешния растеж на ендометриалните клетки и експресията на естрогенни и прогестеронови рецептори [38]. В друг експеримент е конструирана пореста колагенова матрица, натоварена с многоклетъчни

ендометриални органоиди, съдържащи ендометриални стромални и епителни клетки. Тези клетки развиват луминален епителен слой върху повърхността на порестата матрица, който може да бъде успешно трансплантирана [39].

Поредна стратегия е разработването на изкуствен ендометриум, натоварен с множество ендометриални стволови клетки, съставен от два биоразградими естествени полимера като колаген и хиалуронова киселина, за рекапитулация на многоклетъчната и сложна структура на ендометриалната тъкан. След имплантиране на този изкуствен ендометриум, натоварен със стволови клетки, в миши модел успешно са разрешени тежките тъканни увреждания [40].

Яйчникът е друг орган на репродуктивната система, който е обект на възстановяване чрез методите на тъканното инженерство. Понастоящем приблизително 1% от жените развиват преждевременна яйчникова недостатъчност (POF), характеризираща се с хипергонадотропна аменорея и последващо изчерпване (дисфункция) на яйчниковите фоликули преди 40-годишна възраст [41]. В този контекст е разработена пореста биоразградима колагенова матрица, която регулира миграцията и функцията на трансплантираните AD-MSC. Така се увеличават преживяемостта на AD-MSC и нивата на прикрепване в яйчника, като се облекчава POF при модели на гризачи. В допълнение, колагеновата матрица също действа като резервоар за различни биоактивни молекули като цитокини и растежни фактори, които стимулират фоликулното развитие и съзряване [42].

Тъканно инженерство и нанотехнологии

Възлагат се големи надежди, че интегрирането на биологията на стволовите клетки с нанотехнологиите потенциално ще подобри капацитета на диференциация, степента на оцеляване и привързаността към целевите места, което от своя страна значително ще оптимизира терапевтичните резултати от лечението със SC [43]. Ефективното изолиране на недиференцирани клетъчни популации се счита за решава-

що за успешна терапия, базирана на тъканно инженерство. Именно тук е ключовата роля на нанотехнологиите. Разработен е иновативен метод за ефективно изолиране на стволови/прогениторни клетки от мозъка чрез използване на CD133+ антитела, конюгирани с магнитни наночастици (Ab-MNP), които се развиват в невросфери и се диференцират в различни типове клетки [44]. По подобен начин могат да бъдат изолирани CD34+ кръвни прогениторни клетки от циркулацията чрез CD34+ антитела, конюгирани с магнитни наночастици, като се използва магнитен сортировач [45].

Наночастиците навлизат широко и в конструирането на матрици и хидрогелове за оптимално регулиране на поведението на стволовите клетки. Базираните на наноматериали терапевтични подходи са проектирани с помощта на различни биоразградими и биосъвместими наноносители или нановлакна като самосглобяващи се пептиди, въглеродни нанотръби, колагенови наночастици, нановлакна от графен оксид, поликапролактон, трикалциев силикат, титанов диоксид и др. за насърчаване на диференциацията на стволовите клетки и постигане на терапевтичните резултати. Например един експериментален опит разкрива, че наночастици от титанов диоксид, комбинирани с полибутадиенов субстрат, имат синергичен ефект при стимулиране на полиферацията и диференциацията на стволови клетки от зъбна пулпа в костни или зъбни клетки [46].

Друг пример е матрица от пегилирани многостенни въглеродни нанотръби, която значително ускорява остеогенната диференциация на човешки MSC и не показва цитотоксичност [47].

Подобни матрици са разработени и в колагенови хидрогелове, за да имитират 3D-микросреда и да насърчат невралната диференциация на BM-MSC и секрецията на невротрофични фактори.

Поредно приложение на наночастиците е за дългосрочно *in vivo* проследяване на трансплантираните SC. Например карбоксилантирани

квантови точки се локализируют главно в перинуклеарната област на човешки BM-MSC, без да влияят неблагоприятно на тяхната жизнеспособност, и по този начин могат да се използват като неспецифични и ефективни багрила за оцветяване на BM-MSC [48].

Златните наночастици също са широко използвани за изображения с компютърна томография и проследяване на трансплантирани човешки MSC поради своята отлична биосъвместимост и силен коефициент на фотоелектрическа абсорбция [49].

Тъканно инженерство и 3D-биопрINTRиране

3D биопрINTRирането е технология за тъканно инженерство, която позволява прецизно полагане слой по слой на биосъвместими материали, живи клетки и поддържащи компоненти, наричани биомастила, чрез компютърно контролиран процес за имитиране на сложна 3D структурна архитектура и впоследствие за генериране на функционални тъкани или органи [50].

В този контекст технологиите за 3D прINTRиране, комбинирани с различни биоматериали и растежни фактори, преодоляват ниската ефикасност на терапиите, базирани на тъканно инженерство и стволови клетки, като поддържат тяхната специфична микроархитектура, която оказва силно влияние върху клетъчната пролиферация, диференциация и преживяемост.

Един примерен експеримент е разработването на 3D биопрINTRирана тъканна матрица, използвайки BM-MSC и многофункционално нанокomпозитно биомастило, състоящо се от алгинат диалдехид-желатин и мезопорести биоактивни стъклени наночастици. Това е един добър пример за комплексното приложение на тъканното инженерство, нанотехнологиите и 3D биопрINTRирането, който предлага обещаващи бъдещи резултати [51].

По подобен начин е разработена хрущялна матрица, на базата на хидрогел и 3D-биопрINTRиране, като се използва биомастило, съдържащо хондроитин сулфат, аминокетил метакрилат, желатин метакриламид и

метакрилат на хиалуронова киселина [52]. Тази 3D биопрINTRирана матрица демонстрира значително повишена жизнеспособност и хондрогенна диференциация на заредените BM-MSC.

Друг интересен експериментален опит включва проектиране на невронна тъкан, заредена с автоложни AD-MSC, използвайки базирано на фибрин биомастило и микрофлуиден 3D биопрINTRиер, който демонстрира експресията на различни невронни маркери, освобождаване на допамин и електрофизиологична активност [53].

В допълнение, биомиметични тъканноподобни конструкции са разработени за невронно инженерство с помощта на 3D биопрINTRиране с цел лечение на различни невродегенеративни заболявания. В този контекст са разработени малки сферични невронни частици чрез използване на базиран на микрофлуиди Rx1 биопрINTRиер, фибриново мастило и получени от iPSC невронни прогениторни клетки. Тази 3D биопрINTRирана невронна тъкан има способността да експресира различни специфични невронни маркери (TUJ1, FOXA2, NURR1, TH, PAX6) и глиални маркери (GFAP, O4) [54].

Друга стратегия за невронно инженерство включва 3D биопрINTRирана матрица, натоварена с нервни стволови клетки, които поддържат висока клетъчна жизнеспособност (~95%) и улесняват диференциацията на невронните линии за оптимизирани невронни мрежи. 3D биопрINTRираната структура на нервната тъкан значително подобрява регенерацията на аксони и намалява отлагането на глиален белег in vivo [55].

Разгледаните в настоящата публикация съвременни технологии за тъканно инженерство са предимно в предклиничен стадий, но съществуват и някои одобрени продукти на тъканното инженерство за приложение в реалната клинична практика, като: 1) Condress – представлява матрица от колагенова гъба, засята с автоложни стволови клетки от зъбна пулпа, предназначена за трансплантиране на пациенти с хроничен периодонтит с дълбок

интракостен дефект [56]; 2) калциево-фосфатен скелет, натоварен с BM-MSC, предназначен за имплантиране в резорбиран алвеоларен гребен при пациенти с тежка резорбция на мандибуларен гребен [57]; 3) колагенова матрица, заредена с UCB-MSC, предназначена за трансплантиране на пациенти с POF, която реактивира различни овариални функции, като секреция на естроген, фоликуларен растеж и овулация, водещо до успешна клинична бременност [58]; 4) електрозаредена желатинова нанофиброзна матрица, засята с MSC и култивирана в богата на тромбоцити плазма, предназначена за имплантиране на пациенти с дълбоки диабетни язви на краката [58].

ИЗВОДИ

В нашето съвремие са налични редица биоматериали и множество видове стволови клетки, които имитират структурата, архитектурата и функцията на специфични тъкани. Редица проучвания продължават да подобряват разбирането за трансплантирани тъканни миметици и тяхното развитие *in vivo* с цел идентифициране на типа стволови клетки за клинично приложение. Необходими са последващи проучвания, за да се осигури цялостна представа за растежа и интегрирането на биоинженерните тъканни миметици с тъканите на гостоприемника. Различните синтетични или естествени матрици, базирани на биоматериали, могат да осигурят по-дълга и ефективна клетъчна микросреда за задържане на администрираните стволови клетки, пролиферация и диференциация в увредените тъкани и впоследствие повишаване на техния терапевтичен потенциал след приложение.

Въпреки че базираните на стволови клетки терапевтични стратегии за тъканно инженерство са показали успешни резултати в предклинични и клинични изпитвания, все още остават няколко предизвикателства, преди да може да се предвидят обхватът и мащабът на тяхното клинично приложение. Необходимо са допълнителни проучвания за справяне

с имунологичните и свързаните с тях проблеми, предизвикателствата с подходящата интеграция на имплантираните стволови клетки в тъканите на гостоприемника, голямата вариация в терапевтичната ефективност, ефектите върху околните тъкани, прогресията на заболяването или възрастта на пациента. Следователно интердисциплинарните изследвания са абсолютно необходими, преди да могат да се прилагат широко в клиничната практика продуктите на тъканното инженерство, базирани на стволови клетки за възстановяване и регенерация на тъкани и органи. В допълнение, взаимодействията на трансплантираните стволови клетки и базираните на биоматериали матрици в увредените тъкани са сложни и многофакторни и е необходимо да бъдат добре проучени, освен необходимостта от оптимална платформа за насърчаване на функционалното възстановяване. Химичният състав, повърхностната структура, физичните свойства и технологията за синтезиране на биоматериалите трябва да бъдат интензивно изследвани и анализирани, за да се регулират поведението и съдбата на трансплантираните стволови клетки. Тъй като различните тъкани или клетки имат свой собствен химичен състав и физични характеристики, проектираните биоматериали, използвани в тъканното инженерство, трябва да имат силен функционален и структурен афинитет към целевите тъкани и клетъчни типове, за да стимулират правилно тъканната регенерация. Структурните или механичните свойства на повърхността на биоматериала като електрически заряд, химични групи и хидрофобност могат да играят ключова роля в регулирането на техните разнообразни биологични функции.

Освен това характеристиките и тъканният произход на трансплантираните стволови клетки трябва да бъдат определени преди тяхното приложение, още на етап планиране на структурата и синтез на 3D матрица, базирана на биоматериали. Тъканният произход на стволовите клетки е пряко свързан със скоростта на пролиферация, диференциация и съответно регенерация.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тъканното инженерство има за цел регенерация и възстановяване на различни видове тъкани, като използва множество биоинженерни подходи за подобряване на диференциацията и увеличаване на преживяемостта на стволовите клетки след тяхното трансплантиране.

Инженерните подходи, базирани на биоматериална матрица, са предназначени основно за имплантиране на жизнеспособни целеви клетки в порест 3D скелет и сигнални молекули или растежни фактори чрез осигуряване на тъканна архитектура, за клетъчна инфилтрация и пролиферация с цел възстановяване и регенерация на увредена тъкан. Матрицата може да бъде базирана на естествени или синтетични биоматериали, като осигурява различни химични сигнали

и механични опори за трансплантираните стволови клетки на специфични места в увредените тъкани.

Интегрирането на биологията на стволовите клетки с нанотехнологиите потенциално ще подобри капацитета за диференциация, степента на оцеляване и привързаността към целевите места, което от своя страна значително може да оптимизира терапевтичните резултати от лечението със стволови клетки. 3D биопринтирането също е популярна технология за тъканно инженерство, която позволява прецизно полагане слой по слой на биосъвместими материали, живи клетки и поддържащи компоненти, наричани биомастила, чрез компютърно контролиран процес за имитиране на сложна 3D структурна архитектура и впоследствие за генериране на функционални тъкани или органи.

Библиография

1. Salerno A, Netti PA. Review on Computer-Aided Design and Manufacturing of Drug Delivery Scaffolds for Cell Guidance and Tissue Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021 Jun 24;9:682133.
2. Nagano H, Suematsu Y, Takuma M et al. Enhanced cellular engraftment of adipose-derived mesenchymal stem cell spheroids by using nanosheets as scaffolds. *Sci Rep*. 2021 Jul 14;11(1):14500.
3. Liu G, David BT, Trawczynski M, Fessler RG. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev Rep*. 2020 Feb;16(1):3-32.
4. Yan C, Mackay ME, Czymmek K et al. Injectable solid peptide hydrogel as a cell carrier: effects of shear flow on hydrogels and cell payload. *Langmuir*. 2012 Apr 10;28(14):6076-87.
5. Nafea EH, Marson A, Poole-Warren LA, Martens PJ. Immunoisolating semi-permeable membranes for cell encapsulation: focus on hydrogels. *J Control Release*. 2011 Sep 5;154(2):110-22.
6. Peressotti S, Koehl GE, Goding JA, Green RA. Self-Assembling Hydrogel Structures for Neural Tissue Repair. *ACS Biomater Sci Eng*. 2021 Sep 13;7(9):4136-4163.
7. He N, Zhang L, Cui J, Li Z. Bone marrow vascular niche: home for hematopoietic stem cells. *Bone Marrow Res*. 2014;2014:128436.
8. Zhang K, Chen X, Li H et al. A nitric oxide-releasing hydrogel for enhancing the therapeutic effects of mesenchymal stem cell therapy for hindlimb ischemia. *Acta Biomater*. 2020 Sep 1;113:289-304.
9. Yang R, Wang J, Chen X et al. Epidermal Stem Cells in Wound Healing and Regeneration. *Stem Cells Int*. 2020 Jan 29;2020:9148310.
10. Laverdet B, Micallef L, Lebreton C et al. Use of mesenchymal stem cells for cutaneous repair and skin substitute elaboration. *Pathol Biol (Paris)*. 2014 Apr;62(2):108-17.
11. Sasaki M, Abe R, Fujita Y et al. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol*. 2008 Feb 15;180(4):2581-7.
12. Abolghait S, Abdelkader S, Aboushelib M et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and extracellular vesicles enriched collagen chitosan scaffold in skin wound healing (a rat model). *J Biomater Appl*. 2021 Jul;36(1):128-139.
13. Lotfi M, Naderi-Meshkin H, Mahdipour E et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and keratinocytes co-culture on gelatin/chitosan/ β -glycerol phosphate nanoscaffold in skin regeneration. *Cell Biol Int*. 2019 Dec;43(12):1365-1378. doi: 10.1002/cbin.11119.
14. Ma H, Lam PK, Siu WS et al. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells (ADMSCs) and ADMSC-Derived Secretome Expedited Wound Healing in a Rodent Model – A Preliminary Study. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2021 Jun 30;14:753-764.
15. Mardani M, Sadeghzadeh A, Tanideh N et al. The effects of adipose tissue-derived stem cells seeded onto the curcumin-loaded collagen scaffold in healing of experimentally-induced oral mucosal ulcers in rat. *Iran J Basic Med Sci*. 2020 Dec;23(12):1618-1627.

16. Bauer JW, Koller J, Murauer EM et al. Closure of a Large Chronic Wound through Transplantation of Gene-Corrected Epidermal Stem Cells. *J Invest Dermatol.* 2017 Mar;137(3):778-781.
17. Barbier MA, Piacessi AD, Larouche D et al. Efficient Gamma-Retroviral Transduction of Primary Human Skin Cells Using the EF-c Peptide as a Transduction Enhancer. *Curr Protoc.* 2022 Jan;2(1):e353.
18. Ahmad T, Shin HJ, Lee J et al. Fabrication of in vitro 3D mineralized tissue by fusion of composite spheroids incorporating biomineral-coated nanofibers and human adipose-derived stem cells. *Acta Biomater.* 2018 Jul 1;74:464-477.
19. Sartika D, Wang CH, Wang DH et al. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells-Incorporated Silk Fibroin as a Potential Bio-Scaffold in Guiding Bone Regeneration. *Polymers (Basel).* 2020 Apr 7;12(4):853. doi: 10.3390/polym12040853.
20. Redondo LM, García V, Peral B et al. Repair of maxillary cystic bone defects with mesenchymal stem cells seeded on a cross-linked serum scaffold. *J Craniomaxillofac Surg.* 2018 Feb;46(2):222-229.
21. Qiao Z, Lian M, Han Y et al. Bioinspired stratified electrowritten fiber-reinforced hydrogel constructs with layer-specific induction capacity for functional osteochondral regeneration. *Biomaterials.* 2021 Jan;266:120385.
22. Li X, Yang Z, Zhang A. The effect of neurotrophin-3/chitosan carriers on the proliferation and differentiation of neural stem cells. *Biomaterials.* 2009 Oct;30(28):4978-85.
23. Kourgiantaki A, Tzeranis DS, Karali K et al. Neural stem cell delivery via porous collagen scaffolds promotes neuronal differentiation and locomotion recovery in spinal cord injury. *NPJ Regen Med.* 2020 Jun 15;5:12. doi: 10.1038/s41536-020-0097-0.
24. Zarei-Kheirabadi M, Sadrosadat H, Mohammadshirazi A et al. Human embryonic stem cell-derived neural stem cells encapsulated in hyaluronic acid promotes regeneration in a contusion spinal cord injured rat. *Int J Biol Macromol.* 2020 Apr 1;148:1118-1129.
25. Arulmoli J, Wright HJ, Phan DTT et al. Combination scaffolds of salmon fibrin, hyaluronic acid, and laminin for human neural stem cell and vascular tissue engineering. *Acta Biomater.* 2016 Oct 1;43:122-138.
26. Vunjak-Novakovic G, Tandon N, Godier A et al. Challenges in cardiac tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010 Apr;16(2):169-87.
27. Harris LJ, Abdollahi H, Zhang P et al. Differentiation of adult stem cells into smooth muscle for vascular tissue engineering. *J Surg Res.* 2011 Jun 15;168(2):306-14.
28. Rashedi I, Talele N, Wang XH et al. Collagen scaffold enhances the regenerative properties of mesenchymal stromal cells. *PLoS One.* 2017 Oct 31;12(10):e0187348.
29. Roura S, Bagó JR, Soler-Botija C et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells promote vascular growth in vivo. *PLoS One.* 2012;7(11):e49447.
30. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ et al. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med.* 2001 Sep;7(9):1035-40.
31. Lv J, Liu W, Shi G et al. Human cardiac extracellular matrix-chitosan-gelatin composite scaffold and its endothelialization. *Exp Ther Med.* 2020 Feb;19(2):1225-1234.
32. Ch'ng S, Wong GL, Clark JR. Reconstruction of the trachea. *J Reconstr Microsurg.* 2014 Mar;30(3):153-62.
33. Yao ZY, Feng BW, Liu CS et al. The Application of a Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Membrane in the Vascularization of a Decellularized Tracheal Scaffold. *Stem Cells Int.* 2021 Mar 5;2021:6624265.
34. Xu Y, Li Y, Liu Y et al. Surface modification of decellularized trachea matrix with collagen and laser micropore technique to promote cartilage regeneration. *Am J Transl Res.* 2019 Sep 15;11(9):5390-5403.
35. Choi JS, Lee MS, Kim J et al. Hyaluronic Acid Coating on Hydrophobic Tracheal Scaffold Enhances Mesenchymal Stem Cell Adhesion and Tracheal Regeneration. *Tissue Eng Regen Med.* 2021 Apr;18(2):225-233.
36. Xu Y, Dai J, Zhu X et al. Biomimetic Trachea Engineering via a Modular Ring Strategy Based on Bone-Marrow Stem Cells and Atelocollagen for Use in Extensive Tracheal Reconstruction. *Adv Mater.* 2022 Feb;34(6):e2106755.
37. Taniguchi D, Matsumoto K, Tsuchiya T et al. Scaffold-free trachea regeneration by tissue engineering with bio-3D printing. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2018 May 1;26(5):745-752.
38. Xin L, Lin X, Pan Y et al. A collagen scaffold loaded with human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells facilitates endometrial regeneration and restores fertility. *Acta Biomater.* 2019 Jul 1;92:160-171.
39. Abbas Y, Brunel LG, Hollinshead MS et al. Generation of a three-dimensional collagen scaffold-based model of the human endometrium. *Interface Focus.* 2020 Apr 6;10(2):20190079.
40. Park SR, Kim SR, Im JB et al. 3D stem cell-laden artificial endometrium: successful endometrial regeneration and pregnancy. *Biofabrication.* 2021 Aug 16;13(4). doi: 10.1088/1758-5090/ac165a.
41. Welt CK. Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008 Apr;68(4):499-509.
42. Tomaszewski CE, DiLillo KM, Baker BM et al. Sequestered cell-secreted extracellular matrix proteins improve murine folliculogenesis and oocyte maturation for fertility preservation. *Acta Biomater.* 2021 Sep 15;132:313-324.
43. Wang Z, Ruan J, Cui D. Advances and prospect of nanotechnology in stem cells. *Nanoscale Res Lett.* 2009 Mar 21;4(7):593-605.
44. Lui CN, Tsui YP, Ho AS et al. Neural stem cells harvested from live brains by antibody-conjugated magnetic nanoparticles. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2013 Nov 18;52(47):12298-302.
45. Jing Y, Moore LR, Williams PS et al. Blood progenitor cell separation from clinical leukapheresis product by magnetic nanoparticle binding and magnetophoresis. *Biotechnol Bioeng.* 2007 Apr 15;96(6):1139-54.

46. Chuang YC, Chang CC, Yang F et al. TiO₂ nanoparticles synergize with substrate mechanics to improve dental pulp stem cells proliferation and differentiation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021 Jan;118:111366.
47. Li J, Li JJ, Zhang J et al. Gold nanoparticle size and shape influence on osteogenesis of mesenchymal stem cells. *Nanoscale*. 2016 Apr 21;8(15):7992-8007.
48. Kundrotas G, Karabanovas V, Pleckaitis M et al. Uptake and distribution of carboxylated quantum dots in human mesenchymal stem cells: cell growing density matters. *J Nanobiotechnology*. 2019 Mar 13;17(1):39. doi: 10.1186/s12951-019-0470-6.
49. Yu C, Bao H, Chen Z et al. Enhanced and long-term CT imaging tracking of transplanted stem cells labeled with temperature-responsive gold nanoparticles. *J Mater Chem B*. 2021 Mar 28;9(12):2854-2865.
50. Moroni L, Boland T, Burdick JA et al. Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology. *Trends Biotechnol*. 2018 Apr;36(4):384-402.
51. Zhu H, Monavari M, Zheng K et al. 3D Bioprinting of Multifunctional Dynamic Nanocomposite Bioinks Incorporating Cu-Doped Mesoporous Bioactive Glass Nanoparticles for Bone Tissue Engineering. *Small*. 2022 Mar;18(12):e2104996.
52. Costantini M, Idaszek J, Szöke K et al. 3D bioprinting of BM-MSCs-loaded ECM biomimetic hydrogels for in vitro neocartilage formation. *Biofabrication*. 2016 Jul 19;8(3):035002.
53. Restan P, Sharma R, Masri NZ, Willerth SM. 3D Bioprinting Mesenchymal Stem Cell-Derived Neural Tissues Using a Fibrin-Based Bioink. *Biomolecules*. 2021 Aug 21;11(8):1250. doi: 10.3390/biom11081250.
54. Sharma R, Smits IPM, De La Vega L et al. 3D Bioprinting Pluripotent Stem Cell Derived Neural Tissues Using a Novel Fibrin Bioink Containing Drug Releasing Microspheres. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020 Feb 11;8:57. doi: 10.3389/fbioe.2020.00057.
55. Liu X, Hao M, Chen Z et al. 3D bioprinted neural tissue constructs for spinal cord injury repair. *Biomaterials*. 2021 May;272:120771.
56. Ferrarotti F, Romano F, Gamba MN et al. Human intrabony defect regeneration with micrografts containing dental pulp stem cells: A randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2018 Jul;45(7):841-850.
57. Gjerde C, Mustafa K, Hellem S et al. Cell therapy induced regeneration of severely atrophied mandibular bone in a clinical trial. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Aug 9;9(1):213. doi: 10.1186/s13287-018-0951-9.
58. Meamar R, Ghasemi-Mobarakeh L, Norouzi MR et al. Improved wound healing of diabetic foot ulcers using human placenta-derived mesenchymal stem cells in gelatin electrospun nanofibrous scaffolds plus a platelet-rich plasma gel: A randomized clinical trial. *Int Immunopharmacol*. 2021 Dec;101(Pt B):108282.

Адрес за кореспонденция:

Проф. Тони Веков, дмн

e-mail: t.vekov.mu.pleven@abv.bg

Address for correspondence:

Prof. Toni Vekov, PhD, DMedSc

e-mail: t.vekov.mu.pleven@abv.bg

РЕГУЛАЦИЯ НА ЛЕКАРСТВЕНИТЕ ПРОДУКТИ ЗА ГЕННА И КЛЕТЪЧНА ТЕРАПИЯ В ЕС И САЩ – СРАВНИТЕЛЕН АНАЛИЗ

Т. Веков¹, С. Джамбазов², В. Белчева³

¹МБАЛ „Сърце и мозък“ – Плевен

²МУ – Плевен

³Тракийски университет – Стара Загора

Резюме. Лекарствените продукти за генна и клетъчна терапия включват иновативни и сложни биологични продукти, които в повечето случаи изискват обширни и продължителни предклинични и клинични научни експерименти и разработки. Тези продукти са дефинирани и обединени под названието „лекарствени продукти за модерна терапия“ (АТМР) в регулаторната рамка на ЕС и САЩ. В разработката се прави преглед на правните рамки в ЕС и САЩ за АТМР, както и на критериите, които трябва да бъдат изпълнени, за да се определи категорията, в която попада даден продукт. Анализът е извършен чрез документални методи за изследване на регулаторната рамка на лекарствените продукти в ЕС и САЩ, включително специфичните изисквания за АТМР, тяхната класификация и структурата на регулаторния процес преди разрешението за достъп до пазара. Очаква се прогресивният процес на сближаване на регулаторните процедури в ЕС и САЩ да продължи, включително по отношение на терминологията, правните препоръки и изискванията за класифициране.

Ключови думи: генна терапия, клетъчна терапия, регулация, ЕС, САЩ

REGULATION OF GENE AND CELL THERAPY MEDICINAL PRODUCTS IN THE EU AND THE USA – A COMPARATIVE ANALYSIS

T. Vekov¹, S. Djambazov², V. Belcheva³

¹MHAT „Heart and Brain“ – Pleven

²MU – Pleven

³Trakia University – Stara Zagora

Abstract. Gene and cell therapy medicinal products include innovative and complex biological products that in most cases require extensive and prolonged preclinical and clinical scientific experimentation and development. These products are defined and grouped under the name “advanced therapy medicinal products” (ATMPs) in regulatory frameworks of the EU and USA. This paper reviews the EU and USA legal frameworks for ATMPs, as well as the criteria that must be met to determine the category in which a product falls. The analysis was conducted using desk-based methods to examine the regulatory framework for medicinal products in the EU and the USA, including the specific requirements for ATMPs, their classification and the structure of the regulatory process before marketing authorization. It is expected that the progressive process of convergence of regulatory procedures in the EU and the USA will continue, including in terms of terminology, legal recommendations and classification requirements.

Key words: gene therapy, cell therapy, regulation, EU, USA

ВЪВЕДЕНИЕ

Лекарствените продукти за генна и клетъчна терапия включват иновативни и сложни биологични продукти, които в повечето случаи

изискват обширни и продължителни предклинични и клинични научни експерименти и разработки. Тези продукти са дефинирани и обединени под названието „лекарствени про-

дукти за модерна терапия“ (АТМР) в регулаторната рамка на ЕС и САЩ.

Първият АТМР е одобрен в САЩ през 2009 г. с разрешението за клинично приложение на ChondroSelect – тъканноинженерен продукт, показан за лечение на хрущялни дефекти. В САЩ първият одобрен АТМР една година по-късно е Provenge – клетъчна терапия за лечение на някои видове карциноми на простатата. През 2012 г. в ЕС и САЩ е разрешена първата генна терапия – Glybera, за лечение на дефицит на липопротеин липаза [1].

Между възникването на теоретичната концепция за АТМР и първите клинични изпитвания, необходими за регулаторното им одобрение, има значителен времеви период, който се дължи освен на множество предизвикателства, свързани с естеството на генните и клетъчните терапии, но и на регулаторни предизвикателства [2].

Първата стъпка в развитието на регулаторната рамка е дефинирането на продуктите и тяхната класификация. Както в ЕС, така и в САЩ има всеобхватна правна рамка, варираща от химични до биологични лекарствени продукти. Освен това биологичните лекарствени продукти обхващат освен генни и клетъчни терапии, инженерни протеинови и тъканни продукти. В този контекст класификацията на потенциален биологичен продукт често не е толкова тривиална и в някои случаи може да бъде трудно да се различи границата между различните биологични подкатегории. Правилното класифициране на продукт в ранен етап на развитие е критичен момент, тъй като ще определи регулаторната рамка и препоръките на Европейската агенция по лекарствата (ЕМА) и Американската администрация по храните и лекарствата (FDA), които трябва да се следват в целия план за развитие на продукта в съответния регион – ЕС и САЩ.

ЦЕЛ И МЕТОДИКА

Настоящото изложение има за цел да направи преглед на правните рамки в ЕС и САЩ за АТМР, както и на критериите, които трябва да бъдат изпълнени, за да се определи в коя

категория попада даден продукт. Прилики/разликите, които съществуват между ЕС и САЩ, са обсъдени с цел идентифициране на онези нюанси, които могат да повлияят на развитието на АТМР.

Използвани са документални методи за анализ на регулаторната рамка на лекарствените продукти в ЕС и САЩ, включително специфичните изисквания за АТМР, тяхната класификация и структурата на регулаторния процес преди разрешението за достъп до пазара.

Лекарствените продукти за хуманна употреба в ЕС се регулират от Директива 2001/83/ЕО [3] и Регламент 726/2004/ЕО [4]. Биологичните продукти включват много различни типове продукти (ваксини, токсини, серуми и алергени), лекарствени продукти, получени от човешка кръв и плазма (албумин, коагулационни фактори и имуноглобулини), биотехнологични продукти (антитела и АТМР).

КЛАСИФИКАЦИЯ НА АТМР

АТМР включват продукти, които съдържат рекомбинантни нуклеинови киселини или инженерно конструирани клетки и/или тъкани. Тези продукти са разделени на четири подкатегории: 1. Лекарствени продукти за соматична клетъчна терапия (SCTMP); 2. Тъканноинженерни продукти (TEP); 3. Лекарствени продукти за генна терапия (GTMP); 4. Комбинирани АТМР (сАТМР), които се състоят от една от първите 3 категории, комбинирани с едно или повече медицински устройства като неразделна част от продукта.

В ЕС има ясно разграничение между клетъчнобазирани продукти, смятани за АТМР, и клетъчнобазирани продукти, обхванати от други правни рамки, като законите за кръвните продукти и трансплантацията, където тези клетки/тъкани не се приемат за лекарствен продукт и не могат да бъдат комерсиализирани или произведени в индустриален мащаб по етични и правни причини.

Класификацията на АТМР като биологични продукти определя по-широката регулаторна рамка, чрез която се дефинират изискванията за раз-

работването и заявлението за разрешение за търговия, представени в Регламент 1394/2007/ЕО [5]. Освен това Директива 2009/120/ЕО [6] актуализира определенията и подробните научни и технически изисквания за АТМР. Комбинираните АТМР (сАТМР) се регулират не само от указанията за лекарствени продукти, но и от тези за медицински изделия [7].

За разработването на АТМР в ЕС заявленията за клинични изпитвания се подават индивидуално до националните компетентни органи, където ще се провежда изпитването. За разрешение за търговия обаче всички АТМР се оценяват чрез централизирана процедура в ЕМА, като се гарантира, че те се възползват от единна, научнообоснована оценка и разрешение за търговия, приложими в целия ЕС.

В ЕМА са структурирани два комитета, отговорни за валидирането и научната оценка за одобрение на продукта: 1. Комитет за модерни терапии (CAT) и 2. Комитет за лекарствени продукти за хуманна употреба (CHMP).

CAT е отговорна за класифицирането и оценката на качеството, безопасността и ефикасността на АТМР. Разрешение за пускане на пазара чрез централизирана процедура може да бъде предоставено в 3 възможни варианта: 1. Стандартно разрешение за пускане на пазара на АТМР; 2. Условно разрешение за пускане на пазара, когато АТМР отговаря на неудовлетворена медицинска нужда, демонстриран е положителен баланс полза/риск, но представените клинични данни не са достатъчни за статистически значими заключения; 3. Разрешение за пускане на пазара при изключителни обстоятелства, в екстремни ситуации, при които дадено заболяване е рядко или клиничната крайна точка е трудна за измерване [8].

В САЩ, както и в ЕС АТМР се регулират като биологични продукти, защото те съдържат естествени или биоинженерни елементи. От гледна точка на законодателството биологичните продукти включват следните категории: 1. алергени; 2. кръв и кръвни продукти; 3. ваксини; 4. ксенотранспланти; 5. продукти за

генна и клетъчна терапия (CGT), които съставляват групата на АТМР.

АТМР не трябва да се бъркат с друга нормативна категория продукти, наречена „човешки клетки, тъкани и продукти на клетъчна и тъканна основа“ (HCT/PS) или определени като „изделия, съдържащи или състоящи се от човешки клетки или тъкани, предназначени за имплантиране, трансплантиране, инфузия или трансфер в човешки реципиент“ [9]. HCT/PS не се считат за биологични продукти. От друга страна, комбинираните продукти могат да включват два или повече отделно регулирани компонента, като лекарство/устройство, биологичен продукт/устройство, лекарство/биологичен продукт или лекарство/устройство/биологичен продукт. Определението за тези възможни комбинации е широко и взема предвид опаковката и дали всички компоненти на сАТМР са изрично необходими за постигане на предвидената употреба, показание или ефект [10].

През 2016 г. законът CuresAct в САЩ се приема с цел ускоряване на разработването на лекарствени продукти и по-бързо и ефективно пускане на пазара на нови терапии. По този начин се създава нова програма за разработване на концептуално нови терапевтични стратегии, наречена Усъвършенствана терапия за регенеративна медицина (RMAT) [11]. Терапията с регенеративна медицина се определя като: 1. Клетъчна терапия, терапевтичен продукт за тъканно инженерство, човешки клетъчен и тъканен продукт или всеки комбиниран продукт, използващ такива терапии, като изрично са изключени HCT/PS; 2. Продукт, който е предназначен за лечение, модифициране или излекуване на сериозно или животозастрашаващо заболяване или състояние; 3. Ако предварителните клинични доказателства показват, че лекарството има потенциал да отговори на неудовлетворени медицински нужди за такова заболяване или състояние [12].

Следователно това определение имплицитно включва АТМР. Комбиниран продукт може също да отговаря на изискванията за RMAT

обозначение, когато компонент на биологичния продукт осигурява основния начин на действие.

ПРЕГЛЕД НА ПРАВНИТЕ РАМКИ В ЕС И САЩ

Федералната регулаторна рамка на САЩ се състои от два основни закона – Федерален закон за храните, лекарствата и козметиката (FDCA) [13] и Закон за обществените здравни услуги [14], които предоставят на администрацията на FDA в САЩ законови правомощия да регулира лекарствените продукти за хуманна употреба, включително биологични продукти и медицински изделия.

Разпоредбите на FDA се съдържат в Кодекса на федералните разпоредби (CFR) [15], който предоставя подробности за това как FDA прилага дейностите, определени в PHSА и FDCA. В САЩ кандидатите трябва да подадат заявление за изпитване на ново лекарство (IND), за да получат одобрение за клинично изпитване и заявление за лиценз на биологичен продукт (BLA), за да получат разрешение за търговия от FDA. Разрешението за търговия може да бъде стандартно, по процедура за приоритетен преглед или по ускорено одобрение. Приоритетният преглед на заявлението е 6-месечен в сравнение с 10-месечния срок на стандартната процедура. Статут за приоритетен преглед придобиват онези лекарства, които биха довели до значителни подобрения в безопасността или ефикасността на лечението, диагностиката или превенцията на сериозните заболявания в сравнение със съществуващата клинична практика.

Ускореното одобрение от своя страна позволява лекарствата за животозастрашаващи заболявания и състояния, които отговарят на неудовлетворена медицинска нужда, да бъдат одобрени въз основа на сурогатна крайна точка, ако е доказана клинична полза [16].

В рамките на FDA отговорностите за лекарствата, биологичните продукти и медицинските изделия са организирани в осем различни центъра. Центърът за оценка и изследване

на биологични продукти (CBER) има юрисдикция върху различни продукти, вкл. кръв и кръвни продукти, ваксини, алергени, клетъчни, тъканни и генни терапии, както и някои свързани устройства. В рамките на CBER отговорността за ATMP се пада на службата за тъкани и модерни терапии (OTAT), докато комбинираните продукти се възлагат на център на FDA, който има основна юрисдикция за предпазарния преглед и регулиране.

Една от основните разлики в европейското и американското законодателство за биологични продукти е, че FDA контролира клиничните изпитвания, докато ЕМА – не. Относно маркетинговото одобрение ЕС и САЩ имат специфично законодателство в зависимост от нормативната категоризация на продукта. Освен това ЕМА и FDA имат различна специфична структурна организация и комисии за оценка на ATMP. Докато в ЕС ATMP може да бъде класифициран в четири основни групи (GTMP, SCTMP, TEP, cATMP), в САЩ класификационните групи са по-широки и са само 2 – генна терапия и продукти за клетъчна терапия. Като се има предвид, че класификацията в ЕС е по-прецизна, има продукти, които могат да попаднат в повече от една категория, а в някои случаи разпределението в определена група не е толкова тривиално. В САЩ също могат да възникнат трудности при класифицирането на продукти като НСТ/Ps или като биологичен продукт, който не подлежи на минимална манипулация и/или хомоложна употреба.

Друга разлика между сравняваните региони е свързана с терминологията. В САЩ терминът ATMP не е често срещан в законодателни и регулаторни документи, като по-често се използва терминът „клетъчна и генна терапия“ (CGT).

За да осигурят правилна и коректна класификация, както ЕМА, така и FDA предоставят научни съвети на кандидатите за изясняване или потвърждаване на тази класификация преди последващо напредване на разработката. В ЕС една от дейностите на CAT е да изясни класификацията на даден продукт

преди всичко, когато той може да попадне в две различни категории. Винаги е препоръчително да се получава становището на САТ за конкретен продукт, тъй като характеристиките на всеки продукт могат да бъдат уникални и потвърждението на даден продукт като усъвършенствана терапия може да добави стойност за привличане на потенциални инвеститори. В САЩ FDA има подобна практика за предварителни консултации за класификацията на кандидата за продукт. За получаване на становището от FDA и EMA е необходима минимална информация за продукта, за да се получи правилната му класификация, като източник на продукта, предвидена употреба и описание на механизма му на действие.

КЛАСИФИКАЦИОННИ КРИТЕРИИ НА ЕМА И FDA

Класификационните критерии на ЕМА и FDA също имат някои специфични особености въпреки общите принципи:

1. **Генни терапии.** Лекарствените продукти за генна терапия включват *in vivo* терапии, като нуклеинови киселини или генетично модифицирани микроорганизми, и *ex vivo* терапии, като генетично модифицирани човешки клетки или редактиране на човешкия геном. В ЕС, за да се класифицира даден продукт като генна терапия, трябва да бъдат изпълнени всички от следните критерии за включване: 1. Продуктът трябва да бъде биологичен лекарствен продукт, съгласно Директива 2003/63/ЕС [17]; 2. Продуктът трябва да съдържа рекомбинантна нуклеинова киселина; 3. Рекомбинантните нуклеинови киселини трябва да са от биологичен произход, независимо от произхода на използваната векторна система; 4. Рекомбинантната нуклеинова киселина се използва или прилага на хора, за да се регулира, поправи, замени, добави или изтрие генетична последователност; 5. Рекомбинантната нуклеинова киселина трябва да участва директно в терапевтичния, профилактичния или диагностичния ефект на продукта. В САЩ критериите за включване, които трябва да бъдат изпълнени, са следните:

1. Продуктът да отговаря на определението за биологичен продукт съгласно PHSA [14];
2. Продуктът трябва да е приложен за диагностика, лечение или превенция при хора;
3. Продуктът да медира своите ефекти чрез транскрипция или трансляция на трансфериран генетичен материал или чрез специфична промяна на генетични последователности на гостоприемник (човек);
4. Продуктът да може да действа чрез няколко механизма – заместване на ген, причиняващ заболяване, със здраво копие на гена; инактивиране на ген, причиняващ заболяване, който не функционира правилно; въвеждане на нов или модифициран ген в човешкия организъм;
5. Рекомбинантни нуклеинови киселини, използвани за трансфер на генетичен материал, се считат за компоненти на генетичната терапия.

Следователно въпреки използваната различна терминология критериите за включване, които определят GTMP, са еквивалентни в ЕС и САЩ. Например две Т-клетъчни терапии с автоложен химерен антигенен рецептор (CAR) като Kymriah и Yescarta са одобрени наскоро от ЕМА и FDA. Тези терапии са класифицирани като клетъчнобазирани генни терапии и в двата сравнявани региона, тъй като се състоят от генетично модифицирани Т-клетки, които експресират CD19⁻ специфичен CAR, за да лизират CD19⁺ злокачествени В-клетки.

Фактът, че продуктът трябва да бъде биологичен лекарствен продукт, не е второстепенен критерий за включване, тъй като химично синтезираните последователности на нуклеинови киселини ще бъдат изключени от класифицирането като ATMP и ще се считат за химични лекарства, които трябва да бъдат разработени съгласно друга нормативна рамка. Такъв пример са антисенс олигонуклеотидите и аптамерите, одобрени от ЕМА и FDA като химични лекарства.

За разлика от САЩ в ЕС един от критериите за включване в GTMP постановява, че рекомбинантните нуклеинови киселини трябва да са с биологичен произход, независимо от

произхода на използваната векторна система. От друга страна, и в двата региона продуктът трябва да бъде приложен за превенция и лечение на заболяване при хора. Диагнозата обаче нито се цитира като една от основните цели на тези продукти в САЩ, нито дефиницията на САЩ за биологичен продукт (съгласно PHSA) предвижда диагнозата като цел на продукта. В ЕС съществува един критерий за изключване, който изрично налага вето за даден продукт да бъде класифициран като генна терапия, ако е предназначен за лечение или профилактика на инфекциозни заболявания. В този случай продуктът ще бъде класифициран като ваксина, дори ако отговаря на всички необходими изисквания, за да се счита за АТМР. Например модифициран вирус ancapa (MVA), в който са трансфузирани два гена за лечение на недребноклетъчен карцином на белия дроб, се класифицира като GTMP, но ако тези гени водят до експресия на протеин за лечение на HIV, продуктът няма да се счита за GTMP, а за ваксина [18]. Същият принцип се прилага за невирусни вектори като повечето плазмидни DNA- или RNA-базирани продукти. Например лекарственият продукт TriMix е комплекс от няколко mRNA, кодиращи молекули за клетъчно активиране, представляващи антиген. Ако този комплекс от mRNA се комбинира с тумор-асоциирани антигени за лечение на меланом, терапията се класифицира като GTMP, но ако тези mRNA се комбинират с mRNA, кодираща HIV антигени, терапията ще се счита за ваксина [19].

В САЩ не се споменава изричен критерий за изключване на профилактичните и терапевтичните ваксини за инфекциозни заболявания, но на практика те също са изключени от класификацията за GTMP чрез различни насоки за развитие на тези продукти, като обикновено се разглеждат от офиса на CBER, отговорен за преглед на ваксини (OVRR), а не от OTAT [20]. Следователно критерият за изключване на продукт от категорията GTMP както в ЕС, така и в САЩ, е пряко свързан с показанията на продукта. В резултат на това и в двата

региона има отделни насоки, специално ориентирани към разработването на ваксини и продукти за генна терапия.

2. Клетъчни и тъканни терапии. В ЕС SCTMP се различават от TEP. Въпреки това и двата класа продукти споделят един и същ принцип на включване – клетките или тъканите в продукта трябва да бъдат проектирани и модифицирани, като разликата между SCTMP и TEP е в индикацията. За да се счита една клетка или тъкан за проектирана, тя трябва да отговаря на поне един от следните критерии: а. Клетките или тъканите са били обект на съществена манипулация; б. Клетките или тъканите не са предназначени да бъдат използвани за една и съща основна функция у реципиента и у донора (нехомоложно приложение). Относно показанието в случай на SCTMP продуктът се прилага на хора с цел лечение, профилактика или диагностика на заболяване чрез фармакологично, имунологично или метаболитно действие на имплантираните клетки или тъкани, докато в случай на TEP продуктът се прилага с цел регенериране, възстановяване или замяна на човешка тъкан. Следователно ключовият фактор за определяне на продуктовата категория се основава на преобладаващия механизъм на действие на активното вещество и заявената предвидена функция.

Обикновено може да възникне проблем, когато разделителната линия за класифициране на SCTMP или TEP не е ясна. Такъв е случаят, когато продуктът упражнява фармакологично действие, за да регенерира, поправи или замени човешка тъкан. В случаите, когато продуктът отговаря на изискванията както за TEP, така и за SCTMP, трябва да се счита за TEP съгласно Регламента за АТМР [5], въпреки че окончателната класификация трябва да се разглежда за всеки отделен случай – мнението на CAT играе ключова роля. В допълнение, онези продукти, които се състоят от инженерни клетки, предизвикващи регенерация, възстановяване и заместване в нативната тъкан чрез секреция на паракринни фактори, също отговарят на определението за TEP. Счита се,

че ТЕР могат да съдържат клетки или тъкани от човешки или животински произход или и от двата и че клетките или тъканите могат да бъдат жизнеспособни или не, считайки за жизнеспособни клетки тези, които имат функционална цитоплазмена мембрана [21]. В този контекст могат да бъдат направени две класификационни съображения: а. критерий за включване, който автоматично класифицира даден продукт, като АТМР се прилага, когато продуктът съдържа или се състои от модифицирани животински клетки или тъкани; б. критерий за отказ от класифициране като SCTMP или ТЕР се отнася до тези продукти, които съдържат или се състоят единствено от нежизнеспособни клетки или тъкани и не упражняват фармакологично, имунологично или метаболитно действие.

В САЩ продуктите на клетъчна или тъканна основа могат да бъдат категоризирани съгласно регулираната рамка като биологични продукти или HCT/Ps. Дефиницията за клетъчни и тъканни продукти, класифицирани като биологични, включва тези, които са повече от минимално манипулирани или са за нехомоложна употреба, или имат системен ефект, зависещ от тяхната метаболитна активност [22].

Важно е да се отбележи, че в САЩ няма дефинирана продуктова категория за усъвършенствана тъканна терапия. Дефиницията и критериите за класифициране на терапия с човешки соматични клетки (SCT) включват: 1. SCT се състои от прилагане на хора на автоложни, алогенни или ксеногенни живи клетки; 2. Производството на продукти за терапия със SCT включва *ex vivo* размножаване, разширяване, селекция или фармакологично третиране на клетки или други изменения на техните биологични характеристики, в резултат на което клетките се считат за повече от минимално манипулирани; 3. Целта на тези клетъчни продукти е да се използват за терапевтични, диагностични или превантивни цели [23].

Следователно класификацията на клетъчни и тъканни продукти между ЕС и САЩ се раз-

личава. От една страна, в ЕС има разграничение между продуктите, считани за ТЕР или SCTMP, при които разликата е в заявеното показание, докато в САЩ клетъчните и тъканните продукти, които представляват усъвършенствана терапия, ще бъдат класифицирани като SCT. Например MACI (матрично приложени, характеризирани, автоложни, култивирани хондроцити) е продукт, одобрен както в ЕС, така и в САЩ. Той се състои от автоложни хондроцити, посети върху колагенова мембрана от свински произход, показан за възстановяване на симптоматични хрущялни дефекти при възрастни пациенти. Докато в САЩ MACI се счита за клетъчна терапия, в ЕС се класифицира като комбиниран продукт ТЕР, защото заявеният основен механизъм на действие е регенериране и възстановяване на ставния хрущял.

Друго съществено различие между ЕС и САЩ е дефинирането на понятията "манипулиране" и "хомоложна употреба", които имат важно значение за класификацията на продуктите. В ЕС „съществена манипулация“ означава модифициране на биологичните характеристики, физиологичните функции или структурните свойства, които са от значение за предвидената клинична употреба. Например клетъчната сепарация, концентрация или пречистване не е съществена манипулация, ако клетките имат същата биологична активност, както в човешкия организъм, докато клетъчното култивиране с растежни фактори и разширяването на клетъчната култура представляват съществена манипулация.

От друга страна, терминът „същата основна функция“ (или хомоложно приложение) означава, че клетките или тъканите независимо дали са значително манипулирани, или не, се използват за поддържане на първоначалната им функция в същата анатомична или хистологична среда.

Алогенните човешки клетки от острови на Langerhans, които се прилагат за лечение на тежки форми на диабет тип 1, са често срещан пример за клетъчни продукти, които не попадат в групата на АТМР, защото тези клет-

ки могат да бъдат изолирани, пречистени и култивирани чрез методи, които не водят до промяна на биологичните характеристики и се прилагат хомоложно, за да изпълнят същата основна функция.

Въпреки това през 2013 г. продукт, който се състои от жизнеспособни свински панкреатични клетки, капсулирани в алгинатна матрица, е класифициран като SCTMP [19]. В този случай свинските клетки от острови на Langerhans са изолирани от панкреаса на новородени прасенца и са култивирани в продължение на 30 дни, през които клетъчната диференциация настъпва чрез увеличаване на количеството инсулин, освободен от клетките, което се счита за съществена манипулация. Независимо от предпоставките за възможни възражения, трябва да се отбележи, че този продукт се основава на ксеногенни клетки и в резултат на това той автоматично трябва да попадне в категорията ATMP, съгласно нормативната регулация на ЕС.

В САЩ определенията за степен на манипулиране и хомоложна употреба са дефинирани за HCT/Ps и по изключение продуктите, базирани на клетки и тъкани, които не отговарят на критериите за HCT/Ps, могат да се считат за биологичен продукт и следователно – за усъвършенствана терапия [22].

За разлика от ЕС в САЩ има диференцирана дефиниция на минимална манипулация в зависимост от това дали продуктът се състои от структурна тъкан, или не. Минималната манипулация се дефинира като обработка, която не променя характеристиките на тъканта, а за неструктурни тъкани/клетки се считат тези, които изпълняват метаболитни или други биохимични роли в организма – хематопоеични, имунни и ендокринни функции. Смята се, че това разграничаване на структурни от неструктурни тъкани/клетки е необходимо, защото структурните пораждат различни опасения за безопасност и ефикасност.

В допълнение, терминът „обработка“ се дефинира като всяка дейност, извършена върху тъканен/клетъчен продукт, различна от възстановяване, скрининг и тестване на донори,

съхранение, етикетиране, опаковане и разпространение. Клетъчната експанзия, капсулирането, активирането или генната модификация се смятат за повече от минимални манипулации.

Относно хомоложната употреба също има разграничение между структурни и неструктурни тъкани. Терминът „хомоложна употреба“ за структурна тъкан определя, че тъканта е предназначена да бъде използвана за хомоложна функция, когато се използва за заместване на аналогична структурна тъкан, която е увредена или по друга причина не функционира адекватно. Следователно се определя като възстановяване, реконструкция, замяна или допълване на клетки/тъкани на реципиента с HCT/Ps, които изпълняват същата основна функция у реципиента, както и у донора. FDA счита, че структурната тъкан изпълнява нехомоложна функция, когато се използва за цел, различна от изпълняваната в естественото си състояние или местоположение в организма, където такава структурна функция обикновено не се среща.

3. Комбинирани лекарствени продукти за модерна терапия (сATMP). В ЕС има специфична категория за тези продукти, които се състоят от ATMP, комбиниран с медицинско изделие. Примери за медицински устройства в сATMP могат да бъдат скелета, матрици и системи за капсулиране на клетки като микросфери и др. Критериите, на които трябва да отговаря този категориен клас, са, че медицинското изделие трябва да бъде неразделна част от продукта и да се използва в комбинация. Следвайки използвания вече пример за продукта MACI, мембраната от свински колаген се счита за съставна част от продукта и представлява медицинско изделие. Следователно MACI може да бъде причислен към групата на сATMP.

ИЗВОДИ

Проведеният анализ на регулаторната рамка разкрива различията между ЕС и САЩ в категоризацията на съвременните генни и клетъчни терапии и нормативната терминология,

която ги определя. Критериите, които трябва да бъдат изпълнени както в ЕС, така и в САЩ, за да се класифицира даден продукт като АТМР, са подобни, въпреки че ЕС представя по-точна класификация, с по-добре дефинирани критерии за включване в тези категории. ЕС и САЩ са изправени пред аналогични предизвикателства относно регулирането на АТМР поради липса на опит в тази специфична група лекарствени продукти, като допълнителни затруднения се появяват в ЕС поради различните наслагващи се юрисдикции и органи на ниво държава членка. Европейското и американското законодателство и регулаторните насоки, стартирани от ЕМА и FDA, показват както прилики, така и разлики в класификацията на АТМР за двата региона. Не е известно обаче дали тези различия могат да бъдат превърнати в различни окончателни препоръки от регулаторните органи.

Понастоящем броят и типът на одобрените АТМР се различават между двете регулаторни агенции. Обосновката зад тези различия е неизвестна, но изглежда възможно световната хармонизация на процесите, включени в разработването на АТМР, да позволи да се постигнат синхронизирани решения за достъп до пазара.

През последните две десетилетия ЕМА и FDA активно си сътрудничат с цел подобряване на регулаторните постижения, като е създаден

АТМР клъстер в областта на лекарствените терапии. В бъдеще се очаква прогресивният процес на сближаване между двете агенции да продължи, включително по отношение на терминологията, правните препоръки и изискванията за класифициране. В този контекст могат да се предприемат някои стъпки за постигане на синхрон между регулаторите, като общи насоки, увеличен брой паралелни научни съвети на ЕМА и FDA от началото на жизнения цикъл на лекарствения продукт, както и синхронизиран мониторинг след разрешаване на продуктите и генериране на данни за доказателства от реалната клинична практика.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важен елемент в развитието на регулаторната рамка на лекарствените продукти за генна и клетъчна терапия е дефинирането на продуктите и тяхната класификация. Критериите, които трябва да бъдат изпълнени както в ЕС, така и в САЩ, за да се класифицира даден продукт като генна или клетъчна терапия, са сходни, въпреки че ЕС представя по-точна класификация, с по-добре дефинирани критерии за включване в тези категории.

В бъдеще се очаква прогресивният процес на сближаване на регулаторните процедури в ЕС и САЩ да продължи, включително по отношение на терминологията, правните препоръки и изискванията за класифициране.

Библиография

1. Iglesias-Lopez C, Agustí A, Obach M, Vallano A. Regulatory Framework for Advanced Therapy Medicinal Products in Europe and United States Front. Pharmacol. 2019;10, <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00921>
2. Ten Ham RMT, Hoekman J, Hövels AM et al. Challenges in Advanced Therapy Medicinal Product Development: A Survey among Companies in Europe. Mol Ther Methods Clin Dev. 2018 Oct 11;11:121-130. doi: 10.1016/j.omtm.2018.10.003.
3. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use, OJES, L311/67-121, 28.11.2001.
4. Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council laying down Community procedures for the authorisation and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Medicines Agency, OJEC, L136/1-33, 31.03.2004.
5. Regulation (EC) No 1394/2007 of the European Parliament and of the Council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) No 726/2004, OJEC, L324/121-137, 10.12.2007.
6. Directive 2009/120/EC of 14 September 2009 amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to medicinal products for human use as regards advanced therapy medicinal products, OJES, L242/3-12, 15.09.2009.

7. European Commission, The new regulations on medical devices, 2017, <https://ec.europa.eu>
8. Detela G, Lodge A. EU Regulatory Pathways for ATMPs: Standard, Accelerated and Adaptive Pathways to Marketing Authorisation, *J Ther Methods Clin Dev*, 2019 Jan 29;13:205-232. doi: 10.1016/j.omtm.2019.01.010
9. US Food and Drug Administration, Vaccines, blood and Biologics, 2019, <https://www.fda.gov/>
10. US Food and Drug Administration, Combination Product Definition Combination Product Types, 2018, <https://www.fda.gov/>
11. US Food and Drug Administration, 21st Century Cures Act, 2016, <https://www.fda.gov/>
12. US Food and Drug Administration, Regenerative Medicine Advanced Therapy Designation, 2019, <https://www.fda.gov/>
13. Lam C, Patel P. Food, Drug and Cosmetic Act, In: StatPearls [Internet], 2024.
14. Public health service act, [As Amended Through P.L. 118–84, Enacted September 26, 2024].
15. Browse Code of Federal Regulation, US Government Publishing Office Federal Digital System, 2024.
16. US Food and Drug Administration, Fast Track, Breakthrough Therapy, Accelerated Approval, Priority Review, 2018, <https://www.fda.gov/>
17. Directive 2003/63/EC of 25 June 2003 amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to medicinal products for human use, OJES L159/46-94, 27.06.2003.
18. Draper SJ, Heeney JL. Viruses as vaccine vectors for infectious diseases and cancer. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Jan;8(1):62-73. doi: 10.1038/nrmicro2240.
19. European Medicines Agency, Scientific recommendation on classification of advanced therapy medicinal products, EMA/761529/2016, 2016, <https://www.ema.europa.eu>
20. United States Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research. Considerations for plasmid DNA vaccines for infectious disease indications, 2016, <https://www.fda.gov/>
21. European Medicines Agency, Reflection Paper on classification of advanced therapy medicinal products, 2015, <https://www.ema.europa.eu>
22. United States Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research. Regulatory Considerations for Human Cells, Tissues, and Cellular and Tissue-Based Products: Minimal Manipulation and Homologous Use, 2017, <https://www.fda.gov/>
23. United States Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for human somatic cell therapy and gene therapy, 1998, <https://www.fda.gov/>

Адрес за кореспонденция:*Проф. Тони Веков, дмн**e-mail: t.vekov.mu.pleven@abv.bg***Address for correspondence:***Prof. Toni Vekov, PhD, DMedSc**e-mail: t.vekov.mu.pleven@abv.bg*

ИЗИСКВАНИЯ КЪМ АВТОРИТЕ

Приемат се за публикуване: оригинални статии, обзори, клинични случаи, реферати, рецензии, кратки научни съобщения (писма до редактора и др.). Първите три жанра са обект на **рецензиране**, а останалите подлежат на експертна преценка от страна на редколегията.

Кореспондиращият автор посочва свои данни за контакт (електронен адрес, по желание – пощенски адрес и телефон) и **декларира, че материалът не е публикуван досега**, освен като резюме на съобщение, изнесено на научна проява, и не е предложен за публикация другаде. Авторите носят отговорност за съдържанието на публикациите. Представените материали и описаните в тях изследвания следва да съответстват на утвърдените **етични стандарти** относно провеждането на клинични и/или експериментални проучвания с хора (декларация от Хелзинки) и опитни животни. Не трябва да се споменават пациенти с техните имена, инициали или да се предоставя снимков материал, на който те могат да бъдат разпознати. Съблюдава се стриктното спазване на авторското право – текстове с над 10% дословно повторение на чужда публикация се връщат за преработка. Задължително е декларирането на конфликт на интереси, както и наличие на финансова обвързаност на изследването и провеждащите го институции.

Обем (приблизителен) на предлаганите публикации:

Вид публикация	Брой думи в основния текст	Брой думи в резюмето	Брой референции
Оригинална статия	2500-4000	200-300	30
Обзор	3000-5000	100-200	50
Клиничен случай	1000-3000	100-200	20
Кратко научно съобщение, реферат, рецензия	500-1000	–	10

Приемат се файлове на програма **MS Word**. Няма специфични изисквания за размер и вид на шрифта, разстояние между редовете, полета и друго оформление.

Всяка статия започва със заглавие (без съкращения), имена на авторите (без посочване на академични и други титли), тяхната месторабота, обозначена с цифров индекс, резюме в посочения обем, ключови думи. На **английски език** се превеждат заглавието, резюмето, ключовите думи, местоработата, а имената на авторите се транскрибират.

В **резюмето** на всяка оригинална статия се посочват: цел и обект на изследването, основни данни за методиката, резултати и изводи. Резюметата към другите видове статии включват кратка информация без обособена структура. **Ключовите думи** за всеки вид публикация са между 3 и 8 на брой, като могат да бъдат единични думи или кратки словосъчетания.

Оригиналните научни статии имат задължително обособени раздели: „Въведение“, което включва цел на изследването, „Материал и методи“, „Резултати“, „Обсъждане“ и „Изводи/Заклучение“. Могат да бъдат добавени „Благодарности“ (към лица или институции, които са допринесли интелектуално или са оказали техническа, материална или финансова помощ и др.). **Обзорите** обикновено включват „Въведение“, тематични подраздели и „Заклучение/изводи“. **Клиничните случаи** съдържат „Въведение“, „Описание на клиничния случай“, „Обсъждане“ и „Изводи“. **Кратките научни жанрове** следват приблизително структурата на оригиналната статия. **Писмата до редактора** обсъждат критично научен проблем, нерешен към момента, или дискутират друга публикация.

Цитиранията на **библиографските източници** в текста се обозначават с цифри в квадратни скоби по реда на появата им. **Библиографията** се подрежда по реда на поява на източниците в текста. Изписването на всеки източник е на нов ред с арабска номерация. Данните се оформят по следния начин:

– **Статии:** Автор(и). Заглавие на статията. Заглавие на списанието (съкратено), година, том (volumen), номер на книжката (брой) в скоби, страници (от-до). *Пример: Yakub YN, Freedman RB, Pabico RC. Renal transplantation in systemic lupus erythematosus. Nephron, 2019, 27(1):197-201.*

– **Публикации** от сборник: Автор(и). Заглавие. В: (за латиница In:) Заглавие на сборника. Поредност на изданието, редактори. Местоиздаване (град), издателство, година на издаването, страници (от-до). *Пример: Wilkinson AH. Evaluation of the transplant recipient. In: Handbook of Kidney Transplantation. 6th ed. G. M. Danovitch (Ed.). Boston, Little, Brown and Co., 2019, 109-122.*

– **Книги:** Автор(и). Заглавие. Местоиздаване (град), издателство, година на издаването, страници (от-до). *Пример: Шейтанов Й. Системни васкулити. С., Мед. и физк., 2019, 8-11.*

– При цитиране на **електронни публикации**, ползвани от интернет, към авторите и заглавието се добавя и линк към публикацията заедно с датата, на която тя е била достъпна.

Ако авторите са до трима, се изписват фамилията, последвани от инициалите им (без точки). Когато авторите са повече от трима, след името на третия се пише „и др.“ (за латиница – „et al.“).

Настойчиво се препоръчва цитирането (познаването) и на български източници.

Илюстративният материал (таблицы, фигури, снимки) се поставя на съответните места в текста със заглавия и легенди на български език. Заглавията на фигурите не трябва да са включени в изображението. Необходимо е снимките да бъдат с добро качество (поне 300 dpi) и подходящ формат (.jpg, .tif). Таблиците трябва да бъдат предоставени във формат, който може да се редактира, а не като изображения.

Използваните в текста специфични **съкращения** се въвеждат в скоби при първата поява на цялото наименование.

Мерните единици следва да са по системата SI.

Материалите се изпращат на e-mail на главния редактор или научния секретар.