

NAUJOS KAMIENINIŲ LĄSTELIŲ IR REKOMBINANTINIŲ MOLEKULIŲ TECHNOLOGIJOS AUDINIŲ INŽINERIJAI IR REGENERACINEI MEDICINAI

1. Programos vykdytojas - Valstybinis mokslinių tyrimų institutas Inovatyvios medicinos centras

Norminiai etatai skirti programai - 10

2. Programos tikslas

Vykdyti fundamentinius ir taikomuosius mokslinius tyrimus siekiant kurti ir tobulinti naujas inovatyvias kamieninių ir aukštesnės diferenciacijos ląstelių, rekombinantinių molekulių gamybos, audinių inžinerijos ir regeneracinės medicinos technologijas.

3. Programos uždaviniai:

Šios programos mokslinius tyrimus vykdysime dvejomis pagrindinėmis kryptimis.

Siekdami programos tikslo kamieninių ir aukštesnės diferenciacijos ląstelių, bei audinių inžinerijos ir regeneracinės medicinos tyrimų kryptyje išskėlėme šiuos uždavinius:

1. Vykdyti fundamentinius pluripotentiškumo ir diferenciacijos molekulinį mechanizmų tyrimus šiam tikslui panaudojant žmogaus (neembrioninės kilmės) ir gyvūnų kamienines ląsteles (300 tūkst Eur).
2. Tirti endogeninius audinių reparacijos mechanizmus panaudojant kamieninių ląstelių produkuojamus veiksniai (240 tūkst Eur).
3. Kurti naujos kartos terapijos technologijas panaudojant kamieninių ląstelių produkuojamus veiksniai (200 tūkst Eur).
4. Tirti kamieninių ląstelių ir jų mikroaplinkos (kitų tipų ląstelių ir tarpląstelinio užpildo) sąveikos mechanizmus panaudojant naujos kartos audinių inžinerijos metodus (230 tūkst Eur).
5. Tirti natūralių ir sintetinių karkasų panaudojimo galimybes audinių rekonstrukcijai įvairių patologinių būklių metu (210 tūkst Eur.)
6. Vykdyti skirtingo diferenciacijos laipsnio pelių kamieninių ląstelių funkcijos tyrimus in vivo (230 tūkst Eur).

Kita programos darbo kryptis susijusi su rekombinantinių terapinės paskirties baltymų technologijų kūrimu. Keliamas tikslas sukurti pažangias sulietų baltymų valymo technologijas ir panaudoti jas terapiškai svarbių naujų baltymų gamybai ir išgryninimui.

Siekiant numatyto tikslo šioje tyrimų kryptyje keliami uždaviniai:

1. Atrinkti bakterinius kamienus, kurie garantuoja maksimalų naujai sukurtų rekombinantinių SUMO DNR konstrukto stabilumą ir pagaminti, charakterizuoti bakterinių kamienų bankus bei užtikrinti jų ilgalaikį išlaikymą. Eksperimentiškai patikrinti SUMO technologijos pagrindu gaminamų baltymų raišką, tirpumą ir stabilumą (200 tūkst. Eur).
2. Klonuoti SUMO proteazės geną ir atlikti analogiškus bakterinių kamienų tyrimus, užtikrinant SUMO proteazės geno stabilumą ir bakterinio banko sukūrimą bei charakterizavimą (100 tūkst. Eur).
3. Pagaminti bakterijose SUMO proteazę ir ją išgryninti, naudojant chromatografijos metodus. Sukurti metodus SUMO proteazės kiekiui ir aktyvumui nustatyti ir panaudoti juos charakterizuojant rekombinantinę SUMO proteazę (UV VIS, fluorescencija, elektroforezė ir fermentinio aktyvumo įvertinimas) (200 tūkst. Eur).
4. Panaudoti SUMO proteazę sulietų su SUMO baltymų kirpimui ir išvalymui (150 tūkst. Eur).

4. Metodologinis tyrimų pagrindimas:

1. Kamieniškumu pasižyminčių ląstelių išskyrimas iš suaugusio organizmo audinių (pvz., žmogaus placentos, žmogaus periferinio kraujo, įvairių pelės organų) vadovaujantis jau aprašytomis metodikomis ir jas modifikuojant.

2. Saugaus ir efektyvaus ląstelių auginimo ir dauginimo *ex vivo* tyrimai: auginimo terpių priedų, aplinkos atmosferos sudėties, paviršiaus dangos ir auginimo aplinkos formos įtakos stebėjimas.

3. Paviršiaus ir viduląstelinio kamieniškumo ir/arba specializacijos žymenų paieška

tėkmės citometrijos, genų raiškos ir baltymų profilio tyrimų pagalba; mikroskopiniai gyvų ir fiksuotų kultūrų tyrimai; funkciniai mėginiai *in vitro* (migracijos, kontraktiškumo, impulso perdavimo, barjerinio sluoksnio sudarymo, vamzdinių struktūrų formavimo ir kt. mėginiai).

4. Kelių tipų ląstelių auginimas kartu mišinyje, atskirais sluoksniais viename inde, ant nanostruktūriškai skirtingų paviršių tame pačiame inde, trimačiuose karkasuose ir/ar ant sintetinių matricų ir t.t. Auginimo modelio įtakos ląstelių morfologijai ir funkcijai tyrimas. Audinių fragmentų formavimas. Specifinių audinių modelių kūrimas, vaskuliarizavimo problemų sprendimai, audinių modelių pritaikymas ir sertifikavimas toksikologinėm, farmakologinėms ir kitoms studijoms (pvz., plaučių modelio pritaikymas oro taršos tyrimams, kremzlės modelio pritaikymas farmacinių preparatų išbandymams ir t.t).

5. Baltymų chemija – gryninimo procesų kūrimas, išgrynintų baltymų formulavimo paieška ilgalaikiam saugojimui, baltymų stabilizacija.

6. Analizės metodų kūrimas baltymo kokybės kontrolei kuriamo proceso stadijose.

7. Išgrynintų baltymų biologinės funkcijos analizės metodai (sąveika su specifiniais antikūnais).

8. Metodai, pagrįsti antigeno – antikūno sąveika. Jie tinka baltymų kiekybiniam nustatymui tiek mišiniuose, tiek išgrynintuose pavyzdžiuose. Imunofermentinių metodų (ELISA, imunoblotas) ir biomolekulių sąveikos tyrimo sistemų (Biacore, Octet systems) taikymas. SUMO proteazei specifinius antikūnus produkuojančios hibridomos bus gautos suliejus imunizuotų BALB/c pelių blužnies ir mielomines SP2/0 linijos ląsteles. Paviršiaus plazmoninio rezonanso metodu atliekama epitopinė analizė. Kuriamas imunofermentinės analizės (IFA) sistema SUMO proteazės kiekybiniam nustatymui.

VMTI IMC disponuoja pakankamais resursais būtiniais programoje numatytų darbų įvykdymui. Institute veikia modernios ląstelių kultivavimo ir tyrimų laboratorijos aprūpintos šiuolaikine įranga (tėkmės citometrai su ląstelių sorteriu FACARIA II ir FACSAria III, Beckton Dickinson, tėkmės citometras Cyflow Space, Partec; biorektorius Biolevitator, Hamilton; Konfokalinės mikroskopijos sistema Leica SP8; realaus laiko PGR sistemos Stratagene Mx 3005P ir Biorad CFX 96; baltymų izofokusavimo sistema Protean IEF cell, Biorad; mikroplokštelių skaitytuvai Asys UVM340 ir Fluoroskan Ascent FL, Thermo LabSystems, *in vivo* vaizdinimo sistema IVIS200, Perkin Elmer IVIS200, ir kt.).

5. Tyrimų etapai ir jų charakteristika:

Kamieninių ląstelių ir aukštesnės diferenciacijos ląstelių tyrimo ir technologijų kūrimo etapai:

1. Pilotinės studijos numatytomis gydymo/diagnostikos strategijų kūrimo kryptimis (2017-2021 m.): pilotiniai ląstelės biologijos (imortalizuotų, pirminių ir kitų tipų ląstelių) eksperimentai, biosuderinamumo eksperimentai (išbandant naujas matricas ir substratus), naujų ląstelių linijų išskyrimas ir charakterizavimas, biotetikos leidimų paraiškų teikimas, bendradarbiavimo grupių sudarymas (su klinikų gydytojais, klinikinės laboratorijos personalu, užsienio kolegomis ir pan.), atsižvelgiant į pilotinių eksperimentų rezultatus.
2. Pliuripotentiųjų ląstelių *ex vivo* saugaus ir efektyvaus gausinimo metodologijų vystymas (2017-2019 m.);
 - a. auginimo terpių serumo ir atskirų augimo faktorių parinkimas ir išbandymas;
 - b. aplinkos atmosferos deguonies ir kitų dujų kiekio/santykio parinkimas ir išbandymas;
 - c. auginimo indų paviršių padengimo tarpląstelinio matriksu baltymais, jų mišiniais, sintetinėmis medžiagomis, padengimo biologiškai aktyviomis molekulėmis nanodimensijoje tyrimai;
 - d. trimatės auginimo aplinkos formos (trimačiuose ar dvimačiuose modeliuose, bioreaktoriuose) kūrimas ir tobulinimas;

- e. keičiamų kultivavimo sąlygų įtakos ląstelių gyvybingumui, diferencijacijai, morfologinėms ir funkcinėms charakteristikoms tyrimai.

3. Eksperimentinis darbas numatytomis gydymo/diagnostikos strategijų kūrimo kryptimis (2018-2021 m.);

- a. *In vitro* neuroregeneracinio modelio sukūrimas ir išbandymas: neuroregeneracinių danties pulpos kilmės kamieninių ląstelių sekretuojamų veiksnių tyrimai;
- b. kremzlės, kremzlės/kaulo bei sinovijos audinio regeneracijos tyrimai *in vitro*, veikiant kamieninių ląstelių produktais bei pačiomis ląstelėmis;
- c. kraujagyslės fragmentų konstravimas pasitelkiant hidrogelio matricas ir paviršių mikro- ar makro-struktūravimą, kraujagyslių endotelio, lygiųjų raumenų sluoksnio, fibroblastų auginimas *in vitro* ir gautų kraujagyslių mimetikų paruošimas klinikiniam panaudojimui;
- d. pelės kamieninių ląstelių išskyrimo, auginimo ir gausinimo *in vitro* eksperimentai – fundamentinėms žinioms apie embrioninių kamieninių ląstelių potencialumą gauti, pluripotentinių ląstelių palyginimui su multipotentinėmis, totipotentinių ląstelių išgavimo iš pluripotentinių embrioninių kamieninių ląstelių galimiems mechanizms atrasti;
- e. priešūždegiminio ir imunomoduliacinio mezenchiminių kamieninių ląstelių poveikio tyrimai uždegimo, oksidacinio streso ir autoimuninių procesų modeliuose (plaučių LOPL, odos uždegimų ir kituose, vystomuose IMCe) *in vitro* ir *in vivo* (*pelių ir žiurkių organizmuose*). Būtina atrinkti kamieninių ląstelių produktų pristatymo į audinius formas: egzosomos, auginimo terpė, substrato praturtinimas ar ląstelių suspensija; palyginti skirtingų poveikius, atrinkti ir validuoti geriausias.

4. Audinių modelių *in vitro* tyrimams kūrimas ir išbandymas (2017-2021 m.);

- a. partnerystė su fizikų ir chemikų atstovais, klinikos medikais: karkasų, biologiškai aktyvių medžiagų sintezės ir įterpimo bei pirminių ląstelių gavimo klausimai – ląstelių išskyrimas iš klinikinės medžiagos: post-mortem audinių, operacinės medžiagos, donotų audinių likučių (pagal turimus Bioetikos leidimus); trimačių karkasų atranka (iš gatavų produktų), naujų kūrimas, gamyba ir panaudojimas (su partneriais).
- b. Odos, kraujagyslės, kremzlės, plaučių audinio modelių sistemų sukūrimas ir charakterizavimas morfologiškai, imunohistochemiškai ir funkciškai. Tai apima tinkamų ląstelių linijų ar pirminių ląstelių atranką, kultivavimą, atkuriant natyvią aplinką, paruošimą mikroskopijai, imunohistochemijai, funkciniam tyrimams. Pvz., odos epitelio ląstelių auginimas ant pasirinktų kandidatinių substratų, veikimas diferenciacijos terpe (jos sudėties atranka), kultivavimas oro-skysčio paviršiuje bei gauto multisluksninio epidermio audinio charakterizavimas aukščiau paminėtais metodais. Panašiais etapais kuriami ir kiti modeliai.
- c. sėkmingų modelių validavimas, išbandymai realiomis sąlygomis, komercializavimas.

Rekombinantinių baltymų gamybos technologijų kūrimas:

1. Klonavimas (sukurti SUMO baltymo pagrindu paremtą genų suliejimo DNR lygmenyje technologiją, atrinkti bakterinius kamienus, kurie garantuoja maksimalų naujai sukurtų rekombinantinių SUMO DNR konstrukto stabilumą ir pagaminti, charakterizuoti bakterinių kamienų bankus bei užtikrinti jų ilgalaikį išlaikymą, klonuoti SUMO proteazės geną ir atlikti analogiškus bakterinių kamienų tyrimus.) (2017-2018 m).
2. SUMO proteazės gryninimas (pagaminti bakterijose SUMO proteazę ir ją išgryninti,

naudojant chromatografijos metodus. SUMO proteazė turi būti charakterizuota pagal savo aktyvumą, optimizuojamos fermentinės reakcijos sąlygos) (2018-2019 m.)

3. Metodologijos sukūrimas (parengti metodologiją sulietų su SUMO baltymų kirpimui ir išvalymui, panaudojant SUMO proteazę.) (2020 m.)

6. Numatomi rezultatai (nurodyti kokie laukiami rezultatai)

Vykdam šią ilgalaikę mokslinių tyrimų programą numatoma, kad bus pasiekti sekantys rezultatai:

- Planuojame gautus rezultatus publikuoti ISI Web of Science sąrašo žurnaluose su IF, po 3 straipsnius kasmet. Taip pat bus rengiamos publikacijos kituose recenzuojamuose moksliniuose žurnaluose.
- Pasiūlyta keletą gydymo/diagnostikos strategijų lėtinėms neinfekcinėms ir panašioms būklėms (kartu su gydymo įstaigų partneriais).
- Sukurta metodologija rekombinantinių baltymų grynimui, paremta sulietų baltymų (fusion proteins) technologija, panaudojant SUMO (small ubiquitin-like modifier) baltymo proteazę.
- Naujai sukurtų technologijų pagrindu bus rengiamos ir registruojamos patentinės paraiškos.

7. Rezultatų sklaidos priemonės (rezultatų skelbimas, viešinimas ir populiarinimas)

Rezultatų sklaida mokslinei ir plačiajai visuomenei yra neatskiriama mokslinės veiklos dalis. Ypatingai tai aktualu kamieninių ląstelių tyrimų ir taikymo srityje, kadangi tai labai aktyvaus visuomenės dalyvavimo, donorystės, palaikymo iš įvairių bendruomenių (pvz., tam tikrų ligų pacientų), religinių grupių, politikų reikalaujanti medicinos ir mokslo šaka. Rezultatų sklaidos veikla apims jau įprastas priemones: mokslo populiarinimo straipsnius populiarioje spaudoje, pasisakymus žiniasklaidai, dalyvavimą Tyrėjų naktėje ir pan. Tikslinga būtų panaudoti ir kitus kitus metodus: patrauklios, kamieninių ir aukštesnės diferenciacijos ląstelių tyrimus reprezentuojančios interneto platformos sukūrimas, diskusijų ir pokalbių įvairiose interneto medijose inicijavimas, interaktyvių stendų muziejuose ir parodose įrengimas ir t.t.

Pristatysime programos rezultatus tarptautinėse konferencijose (parengti ir pristatyti ne mažiau kaip 3 pranešimai kasmet).

Vykdam programą bus surengta keletą nedidelių konferencijų (ne mažiau 3-jų) tarp potencialių partnerių Lietuvoje, vėliau įtraukiant ir viso Baltijos regiono ir Europos mokslininkus, kurių patirtis reikalinga.

8. Preliminarus programos lėšų paskirstymas (tūkst. Eur)

Eil. Nr.	Išlaidų pavadinimas	2017 metais	2018 metais	2019 metais	2020 metais	2021 metais	Visai programai (suma)
1.	Programai skirti norminiai etatai, lėšos	10 etatų 95,89	10 etatų 95,89	10 etatų 95,89	10 etatų 95,89	10 etatų 95,89	479,45
2.	Kitos lėšos planuojamos programai vykdyti (iš kitų, institutui skirtų valstybės biudžeto bazinio finansavimo lėšų)	316,11	316,11	316,11	316,11	316,11	1 580,55
	Iš viso	412	412	412	412	412	2 060

9. Programos trukmė.

2017 - 2021 metai

10. Programos vadovas

dr. Augustas Pivoriūnas, VMTI Inovatyvios medicinos centro direktoriaus pavaduotojas mokslo reikalams, Kamieninių ląstelių biologijos skyriaus vedėjas, 85 2628413,
a.pivoriunas@imcentras.lt