

mgr Anna Sylwia Figiel-Dąbrowska

**Przedtransplantacyjna optymalizacja funkcji mezenchymalnych
komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej w celu
zwiększenia ich potencjału regeneracyjnego**

**The pre-transplant optimization of adipose-derived mesenchymal
stromal/stem cells for their therapeutic potential enhancement**

Rozprawa na stopień doktora w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: dr hab. n. med. Anna Sarnowska, prof. IMDiK



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa, 2022

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Dynamiczny rozwój współczesnej medycyny regeneracyjnej jest możliwy między innymi dzięki zastosowaniu komórek macierzystych. Ich terapeutyczne właściwości obejmują działanie troficzne, przeciwzapalne i immunomodulacyjne. Aktualny stan wiedzy o właściwościach komórek macierzystych pozwala odpowiednio dobrać źródło i sposób ich pozyskania w celu przeprowadzenia leczenia pacjentów z określonym schorzeniem. Niemniej, w większości przypadków, wciąż limitującym czynnikiem jest niewystarczająca liczba świeżo wyizolowanych komórek, prowadząca do konieczności namnożenia materiału w warunkach *in vitro*. Hodowla komórkowa związana jest z tzw. starzeniem się komórek, które prowadzi do obniżenia tempa proliferacji, ograniczenia właściwości troficznych i immunomodulacyjnych, a także do zwiększania prawdopodobieństwa uszkodzeń w tym mutacji genetycznych mogących prowadzić do transformacji nowotworowej. Dlatego konieczna jest dalsza praca nad standaryzacją warunków izolacji i długotrwałej hodowli komórek do celów terapeutycznych.

Materiał komórkowy do przeprowadzonych doświadczeń stanowiły dwie frakcje komórek pozyskiwanych z tkanki tłuszczowej: mezenchymalne komórki zrębowe/macierzyste – ASC (ang. adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells) otrzymywane metodą enzymatyczną oraz odróżnicowane komórki tłuszczowe otrzymywane metodą tzw. hodowli sufitowej – DFAT (ang. dedifferentiated fat cells) z materiału tkankowego stanowiącego pozostałość po procedurze trawienia enzymatycznego.

Celem głównym przedstawionych badań była optymalizacja warunków hodowli komórkowej *in vitro* umożliwiająca pozyskanie odpowiedniej liczby komórek z jednoczesnym zachowaniem ich bezpieczeństwa biologicznego i pożądanych właściwości terapeutycznych. Do celów szczegółowych należała charakterystyka obydwu wymienionych wyżej populacji komórek macierzystych wywodzących się z tkanki tłuszczowej w zadanych warunkach środowiska, porównanie ich właściwości terapeutycznych (sekrecyjnych, ochronnych i repopulacyjnych), a także – w zakresie klinicznego zastosowania ASC – określenie skuteczności i mechanizmu działania.

Przeprowadzone eksperymenty obejmowały analizę właściwości mezenchymalnych komórek macierzystych pozyskiwanych z tkanki tłuszczowej: ASC oraz DFAT hodowanych w różnych warunkach tlenowych – 5% O₂ (odpowiadające fizjologicznemu stężeniu tlenu w niszach komórek macierzystych) i 21% O₂ (stężenie powszechnie stosowane w hodowli komórkowej). Uzyskane wyniki, potwierdziły mezenchymalny i multipotencjalny charakter obydwu analizowanych frakcji. Wskazały również, że warunki tzw. fizjoksji (5% O₂) w porównaniu do tzw. normoksji (21% O₂), determinują szybsze i jednocześnie stabilne tempo proliferacji z zachowaniem prawidłowej morfologii i wolniejszego wzrostu aktywności β-galaktozydazy (markera starzenia komórkowego), a także

mniejsze ryzyko transformacji nowotworowej. Wykazano, że właściwości pluripotencjalne oceniane w zakresie ekspresji SRTF (*stemnes-related transcriptional factor*) są silniej wyrażone przez DFAT. W modelu współhodowli badanych komórek z organotypową hodowlą skrawków hipokampa szczura, w tym poddanych czasowej deprywacji glukozy i tlenu (OGD; ang. oxygen glucose deprivation), potwierdzono działanie protekcyjne tych komórek, potencjał ASC i DFAT do różnicowania w kierunku neuralnym oraz wydzielanie czynników przeciwzapalnych i wzrostowych.

W oparciu o otrzymane dane przedkliniczne dotyczące mechanizmów oddziaływania ASC z uszkodzoną tkanką nerwową w tym udowodnionym działaniu ochronnym i przeciwzapalnym, przeprowadzono eksperymentalne podanie komórek (wykorzystujące niepasażowane ASC) w trzech wybranych schorzeniach: wtórnym uwolnieniu nerwu po uszkodzeniu i nieudanej próbie rekonstrukcji (ADSC), w stwardnieniu zanikowym bocznym oraz w padaczce lekoopornej o podłożu autoimmunologicznym (ADRC). Obserwacja, prowadzona około zabiegowo i przez okres kolejnych 5-lat, potwierdziła bezpieczeństwo zastosowanej terapii komórkowej (brak poważnych działań niepożądanych), a także wskazała na konieczność powtarzania iniekcji ADRC celem utrzymania osiągniętego efektu terapeutycznego. Obserwowany po podaniu komórek wyrzut cytokin w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz poprawa kliniczna pacjentów utrzymywały się do 3 miesięcy od podania komórek.

Zastosowanie jednoczasowego ostrzyknięcia ASC i neurolizy uszkodzonego nerwu pośrodkowego i łokciowego, po wcześniejszej nieudanej rekonstrukcji i zbliznowaceniu, wskazuje na możliwe proregeneracyjne i przeciw bliznowaceniowe działanie ASC. Uzyskano czuciową i czynnościową poprawę u wszystkich pacjentów (3/3).

Analiza płynu mózgowo-rdzeniowego pacjentów chorych na SLA, u których wykonano iniekcje komórek macierzystych, potwierdziła ich przeciwzapalne właściwości polegające na obniżeniu poziomu TNF- α , IL-1 β i IFN- γ . Obserwowano również zwiększoną sekrecję czynników wzrostowych, immunomodulujących i biorących udział w procesach przebudowy tkanki tj. IL-6, bFGF i MMP-9.

Terapia komórkowa autoimmunologicznej padaczki lekoopornej skutkowała u wszystkich pacjentów (6/6) poprawą funkcji poznawczych i zatrzymaniem regresji rozwojowej. Napady ustąpiły u jednego pacjenta (1/6), u trzech pacjentów odnotowano łagodne i okresowe zmniejszenie napadów (3/6), u dwóch (2/6) brak wpływu podania ADRC na częstość napadów. Analiza płynu mózgowo-rdzeniowego tych chorych wykazała korelację stężenia osteopontyny (OPN) z ustąpieniem napadów.

Uzyskane wyniki wskazują na zasadność terapii z zastosowaniem komórek macierzystych opartej na ich działaniu sekrecyjnym. Materiał do aplikacji klinicznej - ASC i DFAT - może zostać

efektywnie namnożony *in vitro*, w warunkach zbliżonego do fizjologicznego dla niszy komórek macierzystych stężenia tlenu. Warunki te umożliwiają długoterminowe utrzymanie komórek w stanie wysokiej aktywności proliferacyjnej przy jednoczesnym zapewnieniu stabilności genetycznej, co jest podstawowym warunkiem ich bezpieczeństwa biologicznego.