

Prof. dr hab. n. med. Maria Siemionow

Streszczenie wykładu: TERAPIE KOMÓRKOWE W TRANSPLANTOLOGII

Wprowadzenie

Wprowadzenie terapii komórkowych do transplantologii w ciągu ostatnich 20 lat wiąże się nieodłącznie z rozwojem medycyny regeneracyjnej. Termin "medycyna regeneracyjna" został wprowadzony po raz pierwszy w 1992 roku przez Lelanda Keisera w artykule opisującym współczesny system administracji medycznej. Dziś pojęcie regeneracji i rekonstrukcji ma szersze zastosowanie. Obejmuje ono również użycie szeroko rozumianych terapii komórkowych, włącznie z ich zastosowaniem w transplantacji narządów oraz w transplantologii rekonstrukcyjnej, takiej jak przeszczepy kończyn czy twarzy. Testowanie terapii komórkowych wymaga odpowiednich modeli doświadczalnych, co wiąże się nie tylko z wysokimi kosztami, ale również z koniecznością potwierdzenia powtarzalności wyników oraz z etycznymi aspektami w przypadku badań dotyczących komórek macierzystych.

Badania doświadczalne

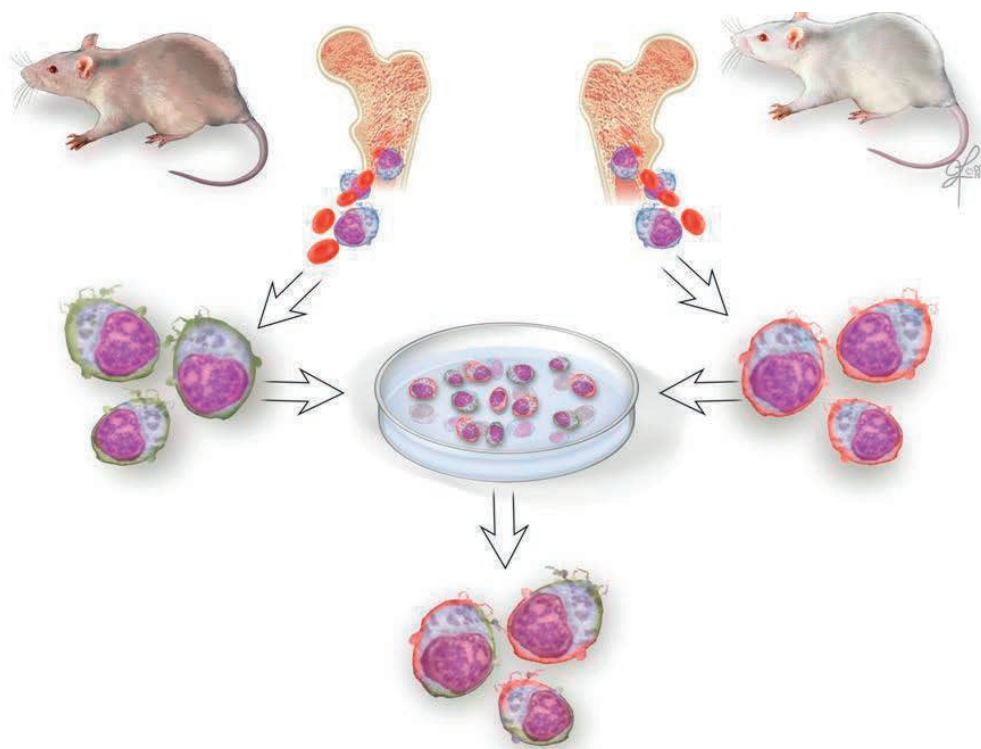
Laboratorium Mikrochirurgii Cleveland Clinic prowadzi od ponad 20 lat badania nad protokołami wzbudzania immunotolerancji u biorców unaczynionych kompozytowych przeszczepów tkankowych. W badaniach przeszczepów kończyn w modelu doświadczalnym szczura, wspomaganym siedmiodniową terapią z użyciem selektywnie blokujących przeciwciał α/β TCR oraz cyklosporyny, uzyskaliśmy tolerancję oraz przeżycie kończyn do ponad 720 dni bez konieczności kontynuowania immunosupresji. Tolerancja w tym modelu związana była z przeszczepieniem unaczynionego szpiku kostnego, pochodzącego z kończyny dawcy i korelowała z obecnością chimeryzmu dawcy we krwi obwodowej biorcy, potwierdzoną w badaniu cytometrii przepływowej.

Wyniki tych badań zachęciły nas do zastosowania nowego protokołu opartego na wzbudzeniu chimeryzmu u biorcy poprzez transplantację szpiku dawcy w immunologicznie trudnym modelu przeszczepu unaczynionego płata skórniego. Uzyskanie znamiennego przedłużenia przeżycia przeszczepu w obecności chimeryzmu dawcy we krwi obwodowej biorcy potwierdziło skuteczność terapii komórkowej w naszym modelu doświadczalnym. Ponieważ utrzymanie chimeryzmu dawcy związane było ze znamienne wydłużoną przeżywalnością przeszczepów, następnym logicznym krokiem było wprowadzenie nowej terapii, której podstawą była fuzja – *ex vivo* komórek szpiku biorcy oraz dawcy wykonana przed przeszczepem celem stworzenia komórek chimerycznych, reprezentujących MHC klasy I zarówno biorcy, jak i dawcy.

Metodyka badań

Proces fuzji i tworzenia komórek chimerycznych był przeprowadzany pierwotnie pomiędzy frakcją leukocytów izolowanych ze szpiku kostnego, pochodzącego od dwóch genetycznie różnych szczurów. Izolowane leukocyty były znaczone oddzielnie barwnikiem fluorescencyjnym, a następnie poddawane procesowi fuzji z użyciem politlenku etylenu (PEG). Podwójnie znaczone: zielono-czerwone komórki fuzyjne (komórki chimeryczne dawcy–biorcy) były następnie

izolowane poprzez cytometrię przepływową i testowane *in vitro* oraz *in vivo* (ryc. 1). W warunkach hodowli *in vitro*, komórki chimeryczne nie wykazywały apoptozy, a ich podanie w trakcie przeszczepu unaczynionych płatów skórnych jako wspomagającej terapii komórkowej wpłynęło na znamienne przedłużenie przeżycia przeszczepu.



Ryc. 1. Proces przygotowania fuzji komórek z dwóch genetycznie różnych szczurów. Szpik kostny po izolacji zostaje oczyszczony i fluorescencyjnie barwiony (kolor czerwony lub zielony). Fluorescencyjnie zabarwione komórki są następnie fuzjowane *ex vivo* i selekcjonowane poprzez cytometrię przepływową, by wyizolować tylko podwójnie barwione zielono-czerwone komórki.

Sukces zastosowania komórek chimerycznych jako terapii wspomagającej w modelu doświadczalnym przyczynił się do dalszego rozwoju tej technologii w kierunku badań klinicznych. Pierwszym krokiem było opracowanie technologii fuzjowania ludzkich komórek, których źródłem była krew pępowinowa. Zaletą użycia komórek macierzystych z krwi pępowinowej do celów terapeutycznych jest ich niska immunogenność, niewielkie ryzyko zakażeń wirusowych oraz niski wskaźnik zachorowalności na chorobę przeszczep przeciwko gospodarzowi.

Pierwsze ludzkie komórki chimeryczne z krwi pępowinowej zostały utworzone w procesie fuzji przeprowadzonej *in vitro* w Laboratorium Mikrochirurgii. Możliwość sfuzjowania dwóch komórek pochodzących od genetycznie niespokrewnionych dawców jest przełomem w badaniach nad mechanizmem reakcji immunologicznych w transplantologii. Badania PCR komórek chimerycznych potwierdziły obecność materiału genetycznego pochodzącego od obydwu dawców komórek krwi pępowinowej. Obecnie ludzkie komórki chimeryczne są w fazie testów prowadzonych na modelu atymicznym szczura w celu określenia ich potencjału migracyjnego, właściwości proliferacyjnych oraz przeżywalności w warunkach *in vivo*. Zastosowanie komórek chimerycznych jako terapii wspomagającej w transplantologii pozwoliłoby zmniejszyć dawkę leków immunosupresyjnych lub potencjalnie wyeliminować konieczność dożywotniej immunosupresji.

Podsumowanie

Celem badań nad ludzkimi komórkami chimerycznymi jest nie tylko ocena ich charakterystycznych cech immunologicznych, lecz również utworzenie w przyszłości banku komórek chimerycznych. Bank komórek chimerycznych zapewniałby źródło komórek terapeutycznych, które mogłyby być użyte „na zamówienie” w zależności od potrzeb m.in. jako terapia wspomagająca transplantację narządów oraz kompozytowych przeszczepów tkankowych, takich jak np. przeszczep twarzy.

Metoda fuzji *in vitro* i tworzenie komórek chimerycznych może być w przyszłości stosowana do uzyskania potrójnych, czy nawet poczwórnych chimer służących odnowie szpiku kostnego u pacjentów z zespołami niewydolności immunologicznej, w przypadku leczenia białaczek oraz u pacjentów po agresywnej chemioterapii, radioterapii lub w chorobie popromiennej.

Innowacyjność użycia komórek chimerycznych w medycynie regeneracyjnej otwiera nowe możliwości terapeutyczne, dzięki którym metoda fuzji może zapewnić tańsze, szybsze i bardziej skuteczne efekty terapeutyczne.