

Streszczenie w języku polskim

Wpływ wybranych parametrów na metabolizm ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych oraz ich potencjał regeneracyjny w terapii leczenia ran

Wstęp

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej jest kompleksowa analiza wpływu wybranych warunków hodowli in vitro na metabolizm ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) oraz ocena ich skuteczności terapeutycznej w klinicznym modelu trudno gojących się ran na przykładzie zespołu stopy cukrzycowej (ZSC). W obliczu dynamicznego rozwoju medycyny regeneracyjnej oraz potrzeby opracowania skutecznych metod wspomagających procesy naprawcze tkanek, kluczowe staje się poznanie mechanizmów warunkujących korzystne działanie MSC na regenerację uszkodzeń tkankowych.

MSC charakteryzuje zdolność samoodnowy, wielokierunkowego różnicowania (w kierunku osteoblastów, chondrocytów czy adipocytów) oraz efektywne działanie parakryne, przejawiające się modulacją odpowiedzi zapalnej oraz pobudzaniem angiogenezy. Dotychczasowe wyniki badań wskazują na potencjalne zastosowanie statyn, leków o właściwościach plejotropowych, mogących wzmacniać funkcje MSC w określonych warunkach środowiskowych. Dodatkowo istotnym czynnikiem modulującym metabolizm, proliferację i różnicowanie MSC jest stężenie tlenu w środowisku hodowli (normoksja versus hipoksja).

Zrozumienie mechanizmów prowadzących do poprawy gojenia ran w warunkach zwiększonych wymagań metabolicznych oraz w środowisku zaburzonej perfuzji (jak w cukrzycy) jest nieodzowne do wdrożenia innowacyjnych terapii w codziennej praktyce klinicznej. Niniejszy cykl publikacji przyczynia się do poszerzenia wiedzy o działaniu statyn oraz hipoksji na MSC, a także o protokoły kliniczne stosowania MSC w trudno gojących się ranach.

Dotychczas żadna praca naukowa nie oceniała łącznego wpływu statyn oraz ograniczenia stężenia tlenu w ramach hodowli MSC. Przedmiotem pracy nr 1 był wpływ atorwastatyny oraz rosuwastatyny na MSC w zróżnicowanych warunkach tlenowych, również z uwzględnieniem wieku dawców. W pracy nr 2 przeprowadzono badania in vivo: mezenchymalne komórki macierzyste, izolowane z tkanki tłuszczowej (ADSC), aplikowano do

ran w obrębie stopy cukrzycowej, w celu weryfikacji skuteczności terapii komórkowej w leczeniu trudno gojących się ran. W pracy nr 3 dokonano przeglądu literatury i wyników dotychczasowych badań, aby ułatwić przyszłym badaczom optymalne projektowanie terapii komórkowych przy leczeniu ran w stanach takich jak zespół stopy cukrzycowej czy inne przewlekłe owrzodzenia.

Materialy i metody

W pierwszym etapie badań wykorzystano ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste pozyskane ze szpiku kostnego (BM-MSC), które pobrano od 12 pacjentów po uzyskaniu ich pisemnej zgody. Badanie rozpoczęto po uzyskaniu zgody Lokalnej Komisji Bioetycznej. Zostało ono przeprowadzone w Klinice Immunologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Przeprowadzono standardową charakterystykę fenotypową komórek (ekspresja antygenów CD73, CD90, CD105 oraz brak ekspresji m.in. CD45, CD34) oraz poddano je testom różnicowania do linii osteogenicznej, chondrogenicznej i adipogenicznej.

Dla oceny wpływu warunków tlenowych zastosowano dwa środowiska hodowli. W pierwszej grupie hodowli zastosowano środowisko normoksyjne (21% O₂, standardowe warunki laboratoryjne), natomiast w drugiej środowisko hipoksyjne (2% O₂, odzwierciedlające środowisko niedotlenienia komórek). Komórki inkubowano z atorwastatyną w stężeniu 0,05 μM (zbliżonym do fizjologicznego stężenia terapeutycznego u pacjentów) oraz z rosuwastatyną w stężeniu 0,04 μM. Dodatkowo przeprowadzono testy cytotoksyczności z użyciem niższych stężeń oraz stężenia 1 μM. Badano proliferację metodą BrdU (5-bromo-2'-deoksyurydyna) oraz cytotoksyczność za pomocą aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w podłożu.

Praca nr 2 podsumowuje badanie kliniczne z udziałem pacjentów z trudno gojącymi się ranami zespołu stopy cukrzycowej. Badanie rozpoczęto po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej (KB/128/2019 24.06.2019 i KB/3/A2021 18.01.2021). Zostało ono zarejestrowane w zbiorze ClinicalTrials.gov pod numerem NCT03865394. Grupa badana obejmowała 47 pacjentów podzielonych na dwie podgrupy: pacjentów otrzymujących ADSC w fibrynowym nośniku lub otrzymujących sam fibrynowy klej tkankowy (grupa kontrolna). ADSC izolowane z tkanki tłuszczowej zdrowych dawców aplikowano na powierzchnię ran, monitorując następnie przebieg gojenia oraz czas potrzebny do uzyskania 50-procentowej redukcji powierzchni owrzodzenia. Ponadto w materiale pobieranym z rany

przeprowadzono analizy proteomiczne, a także ocenę obecności DNA pochodzącego od dawców komórek, w celu zweryfikowania ich czasu przeżycia w miejscu podania.

Praca nr 3 stanowi przegląd literatury naukowej, w którym autorzy podsumowują:

- mechanizmy działania MSC (m.in. efekty parakryne, immunomodulacja),
- wyniki najważniejszych badań przedklinicznych i klinicznych z zastosowaniem MSC,
- potencjalne modyfikacje protokołów terapeutycznych, takie jak zastosowanie prekondycjonowania komórek macierzystych, modyfikacje genetyczne czy wykorzystanie rusztowań wspomagających przeżycie i integrację komórek w ranie,
- ograniczenia i perspektywy rozwoju terapii MSC w leczeniu ran przewlekłych, zwłaszcza w cukrzycy.

W przeglądzie zwrócono również uwagę na kwestie bezpieczeństwa stosowania MSC, ze szczególnym uwzględnieniem ryzyka immunogenności w warunkach allogenicznych oraz możliwych reakcji zapalnych.

Wyniki

Obserwacje poczynione w pracy nr 1 określają optymalne warunki prekondycjonowania przy użyciu statyn oraz zmiennego stężenia tlenu dla najbardziej efektywnego działania MSC.

Wykazano, że:

- atorwastatyna w stężeniach zbliżonych do fizjologicznych istotnie zwiększała proliferację MSC, zarówno w warunkach normoksji, jak i hipoksji, nie wywołując przy tym znaczącej cytotoksyczności;
- rosuwastatyna w warunkach hipoksji również stymulowała proliferację bez istotnych efektów toksycznych, natomiast w normoksji nieco częściej powodowała niewielkie wzrosty cytotoksyczności (zależne od stężenia leku);
- hipoksja *per se* zwiększała zdolności proliferacyjne MSC, co może oznaczać, że komórki w warunkach niskiego stężenia tlenu lepiej adaptują się do środowiska z jego ograniczonym dostępem (np. w tkankach niedokrwionych);
- wiek dawców nie wykazał w analizach istotnego różnicującego wpływu na odpowiedź komórkową w kontekście statyn w testowanych populacjach (choć ogólnie starszy wiek dawców może korelować ze zmniejszoną aktywnością proliferacyjną MSC).

W pracy nr 2 zaobserwowano następujące wyniki wielotygodniowej obserwacji pacjentów z ZSC:

- zmniejszenie powierzchni rany następowało szybciej w grupie otrzymującej ADSC niż w grupie kontrolnej, co potwierdzono zarówno krótszym czasem do redukcji powierzchni owrzodzenia o 50%, jak i większym odsetkiem pełnego wygojenia do końca obserwacji;
- analiza proteomiczna wskazała na wzmożoną ekspresję białek odpowiadających za procesy regeneracyjne i angiogenezę (GAPDH, CAT i inne)
- wykrywalność DNA dawców w miejscu rany utrzymywała się do około 2-3 tygodni od aplikacji MSC; co sugeruje, że allogeniczne MSC mogą przetrwać w środowisku rany wystarczająco długo, by zainicjować korzystne zmiany w przebiegu gojenia;
- nie zanotowano poważnych zdarzeń niepożądanych bezpośrednio związanych z podaniem MSC, co przemawia za bezpieczeństwem stosowania takiej terapii w warunkach klinicznych.

Wyniki badań 1 i 2 miały znaczący wpływ na powstanie pracy poglądowej (praca nr 3), która podsumowuje dotychczasowe obserwacje i nakreśla kierunki dalszych badań nad wykorzystaniem komórek macierzystych w terapii leczenia ran:

- mechanizm działania MSC w ranach obejmuje immunomodulację (m.in. zmiana profilu cytokin pro- i przeciwzapalnych), stymulację angiogenezy (poprzez sekrecję czynników wzrostu, np. VEGF) oraz bezpośrednie wspomaganie procesu tworzenia nowej tkanki;
- wpływ parametrów hodowli (stężenie tlenu, obecność leków plejotropowych, wiek dawcy itp.) może optymalizować terapeutyczny potencjał MSC;
- strategie usprawniania terapii: modyfikacje genetyczne, aktywacja MSC bodźcami (np. hipoksja, czynniki wzrostu), łączenie komórek z rusztowaniami (np. hydrożele czy konstrukty tkankowe);
- zagadnienia bezpieczeństwa i standaryzacja: szczególną uwagę należy zwrócić na czystość mikrobiologiczną preparatu, ryzyko reakcji immunologicznych przy przeszczepach allogenicznych oraz na standaryzację protokołów wytwarzania MSC.

Wnioski

Zaprezentowany cykl publikacji potwierdza, że zarówno warunki hodowli w hipoksji, jak i zastosowanie statyn w odpowiednich stężeniach mogą pozytywnie wpływać na proliferację i funkcje ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych *in vitro*. Tak zoptymalizowane MSC, w połączeniu z odpowiednimi technikami podania (np. za pomocą klejów tkankowych czy hydrożeli), mają szansę usprawnić gojenie ran w modelu klinicznym, szczególnie w tak wymagającej grupie pacjentów jak chorzy z zespołem stopy cukrzycowej.

W warunkach klinicznych terapia komórkowa z użyciem allogenicznych ADSC w stopie cukrzycowej prowadziła do przyspieszenia procesu gojenia ran i wyższej częstości całkowitego wygojenia, bez istotnych zdarzeń niepożądanych. Analizy proteomiczne oraz obserwacje żywotności komórek w ranie potwierdzają, że MSC nie tylko przetrwały w trudnym środowisku miejscowym, ale też aktywnie modulowały lokalną odpowiedź zapalną i stymulowały procesy naprawcze poprzez zwiększoną ekspresję białek proangiogennych oraz immunomodulujących.

Praca pogładowa stanowi wskazówkę dla przyszłych badaczy, pokazując z jednej strony potencjał MSC w regeneracji tkanek przy różnego rodzaju owrzodzeniach, a z drugiej wyzwania związane z przejściem od badań laboratoryjnych do rutynowych zastosowań klinicznych. Istotne obszary rozwoju to: precyzyjne określenie optymalnych dawek i częstotliwości podań, wdrożenie spersonalizowanych protokołów (np. z uwzględnieniem dodatkowych czynników, takich jak wiek pacjenta czy stan zaawansowania owrzodzenia), a także dalsze doskonalenie metod modyfikacji MSC w celu zwiększenia ich przeżywalności w tkankach.

Podsumowując, przedstawiony cykl publikacji dostarcza spójnego obrazu wielopłaszczyznowych badań, wykazujących korzystne działanie MSC w środowisku hipoksji i pod wpływem statyn oraz potwierdzających skuteczność i bezpieczeństwo zastosowania terapii komórkowej w leczeniu przewlekłych ran u pacjentów z cukrzycą. Wyniki te mogą stać się podstawą dalszego rozwoju medycyny regeneracyjnej i wdrażania innowacyjnych rozwiązań w codziennej praktyce klinicznej.