

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Wydział Medycyny Weterynaryjnej
Katedra Biostruktury i Fizjologii Zwierząt

ROZPRAWA DOKTORSKA

Izolacja, hodowla i charakterystyka mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z rąbka rogówki i ich potencjalne zastosowanie w okulistyce weterynaryjnej.

Lek. wet. Paweł Stefanowicz

Przychodnia Weterynaryjna „Retina”

Promotor: prof. dr hab. Maciej Janeczek

Promotor pomocniczy: dr Tomasz Gębarowski

WROCLAW 2023

7. Streszczenie.

Ciężkie urazy i owrzodzenia rogówki stanowią jedną z najczęstszych przyczyn pogorszenia jakości widzenia, a nawet ślepoty. W wielu przypadkach konieczne jest leczenie chirurgiczne w postaci keratoplastyki, przeszczepu spojówkowo-rogówkowego lub przeszczepu spojówki, a jeśli uszkodzenie jest bardziej rozległe i obejmuje obszar rąbka, może prowadzić do niedoboru komórek macierzystych rąbka (LSCD). W takich przypadkach sam przeszczep rogówki lub jej uzupełnienie materiałami protetycznymi lub spojówką nie będzie wystarczającą metodą leczenia. Jedynym skutecznym sposobem leczenia podobnych uszkodzeń jest przeszczep tkanki rąbka lub przeniesienie nabłonkowych komórek macierzystych rąbka (LMSC). Chociaż donoszono także o korzystnych efektach allogennego przeszczepu rąbka, niedobór tkanki rąbka i silna odpowiedź immunologiczna na alloprzeszczep są głównymi przeszkodami w takich protokołach leczenia. Dlatego bardziej obiecującą metodą leczenia jest przeszczep rąbkowych komórek macierzystych LMSC. Alternatywnym źródłem komórek macierzystych do regeneracji powierzchni oka są mezenchymalne komórki macierzyste (MSC). Komórki te można stosunkowo łatwo otrzymać w wystarczającej ilości z różnych typów tkanek (np. szpiku kostnego, tkanki tłuszczowej) i namnażać *in vitro* do autologicznego zastosowania. Nie ma jednak jak dotąd bezpośrednich dowodów na to, że MSC mogą wspomagać gojenie i regenerację uszkodzonej tkanki rogówki tak skutecznie, jak specyficzne tkankowo LMSC. Znacząca część badanych terapii z wykorzystaniem MSC opierało się na miejscowym ich podawaniu bez naruszenia ciągłości ściany gałki ocznej lub na iniekcjach okołogałkowych oraz na podaniach dożylnych. Ze względu na histofizjologię rogówki okazało się, że aplikacja MSC do wnętrza oka jest postępowaniem ryzykownym bez istotnych przewidywanych korzyści dla rogówki. Powyższe fakty oraz konieczność utrzymania odpowiednio długiego i ścisłego kontaktu transplantowanych LMSC z łożyskiem uszkodzonej rogówki powodują potrzebę zastosowania nośnika umożliwiającego przyleganie i migrację komórek. Podłoże powinno także dostarczać czynniki stymulujące wzrost jak związki organiczne czy bodźce fizyczne oraz umożliwiać dyfuzję składników odżywczych oraz innych wytwarzanych substancji, a także utrzymywać odpowiednie parametry mechaniczne i fizykochemiczne, sprzyjające integracji i dalszemu rozwojowi tkanki.

Badania nad terapiami komórkowymi w medycynie prowadzone są od ponad ćwierćwiecza, ale pomimo intensywnego, wieloletniego zaangażowania instytucji naukowych na rynku dostępny jest dotychczas tylko jeden opatentowany ATPM (produkt leczniczy terapii zaawansowanej - Advanced Therapy Medicinal Product) zatwierdzony w 2015 r. przez Europejską Agencję Leków, tj. preparat Holoclar.

Również medycyna weterynaryjna zmagająca się z podobnymi problemami w terapii rogówki poszukuje swojej drogi na polu terapii regeneracyjnych w przypadkach uszkodzeń, zmian zwyrodnieniowych i blizn rogówkowych oraz trwałych uszkodzeń rąbka.

Celem niniejszej pracy była ocena klinicznych i technologicznych możliwości opracowania metody pozyskiwania rąbka rogówki od psa domowego (*Canis lupus familiaris*) i kota (*Felis catus*) i ustabilizowania jednorodnej warstwy komórek macierzystych rąbka na podłożu umożliwiającym ich przeniesienie i utrzymanie na leczonej powierzchni rogówki.

Założeniem było także uzyskanie szybkiej adhezji komórek do powierzchni wzrostowej niezależnie od ilości i jakości materiału, oraz uzyskanie w ciągu 72 godzin proliferujących komórek hodowli pierwotnej dla minimum 90% izolacji. Zastosowana substancja musiała spełniać wymagania prawne dla surowców farmaceutycznych. Wcześniejsze doświadczenia wskazywały na słabą adhezję izolowanych komórek i eksplantów do standardowych powierzchni wzrostowych, a proces zazwyczaj był długotrwały (około 2 tygodni) i cechował się niską powtarzalnością.

Celem pracy badawczej była zatem modyfikacja powierzchni wzrostowej w celu uzyskania szybkiej adhezji eksplantów, oraz migracji komórek na powierzchnię wzrostową.

W ramach prowadzonych badań uzyskaliśmy w pełni powtarzalną metodę wytworzenia prototypu preparatu inżynierii tkankowej w postaci autologicznych LMSC na membranie kolagenowej uformowanej na kształt soczewki kontaktowej gotowy do implantacji u pacjenta. Prowadzone przez nas badania wykazały, że pobrane fragmenty rąbka zawierające LCMS transportowane do laboratorium do 72 godzin stanowią dobry materiał wyjściowy do procesu izolacji i namnażania LMSC.

W trakcie badań wyizolowano rąbek od 20 pacjentów; w tym 8 kotów (5 samic i 3 samce) oraz 12 psów (6 samic i 6 samców). W grupie kotów wiek dawców wahał się od 3 do 20 lat. Najmłodszy pies miał 10 miesięcy, a najstarszy 16 lat. Część dawców (8 psów i 1 kot) była w trakcie leczenia okulistycznego, które na skutek ciężkości procesu zakończyło się enukleacją. W dwóch przypadkach (1 kot i 1 pies) pobrano rąbek od pacjenta bezpośrednio po mechanicznym urazie gałki ocznej. W 3 przypadkach (2 psy i 1 kot) rąbek pobrano od

pacjentów z rozpoznaniem nowotworzenia w obrębie gałki ocznej. W jednym przypadku (1 kot) oko, z którego pobrano rąbek nosiło cechy atrofii pozapalnej (rozległe zmiany w rogówce i zmniejszenie gałki ocznej). U jednego z kotów w chwili pobrania rąbka stwierdzano objawy Zakaźnego zapalenia otrzewnej (FIP). U 4 psów stwierdzano różnego stopnia problemy kardiologiczne. U 4 dawców (4 psy) w historii leczenia występowała choroba nowotworowa bez związku z objawami okulistycznymi (u 2 psów aktywna faza choroby nowotworowej o charakterze pozaokulistycznym).

Badania pozwoliły także na stwierdzenie, że możliwe jest pobranie, namnożenie i ustabilizowanie na podłożu kolagenowym LMSC pozyskanych także od pacjentów w zaawansowanym wieku oraz od pacjentów, których oko donorowe objęte było procesem chorobowym jak jaskra i rozległy wrzód rogówki.

Badania wykazały, że na jakość materiału komórkowego nie miały istotnego wpływu choroby pozaokulistyczne występujące u dawców w chwili pobrania fragmentu rąbka. Kolejnym krokiem będzie wprowadzenie wytworzonego przez nas prototypu inżynierii komórkowej w ramach terapii eksperymentalnej.

8. Abstract.

Severe corneal injuries and ulcerations are one of the most common causes of impaired vision and even blindness. Surgical treatment in the form of keratoplasty, conjunctival grafting, or prosthetic material use is required in many cases, but if the damage is more extensive and involves the limbal area, it can lead to limbal stem cell deficiency (LSCD). In such cases, corneal transplant alone or its supplementation with prosthetic materials or conjunctiva will not be a sufficient method of treatment. The only effective treatment for such damage might be the limbal tissue transplantation or limbal mesenchymal stem cell (LMSC) transfer. Although beneficial effects of allogeneic limbal transplantation have also been reported, the scarcity of limbal tissue and the strong immune response to allograft are major obstacles to such treatment protocols. Therefore, a more promising treatment seems to be the LMSC limbal stem cell transplantation. An alternative source of stem cells for ocular surface regeneration is mesenchymal stem cells (MSCs). These cells can be relatively easily obtained in sufficient amounts from various types of tissues (eg, bone marrow, adipose tissue) and propagated in vitro for autologous use. However, there is as yet no direct evidence that MSCs can promote the healing and regeneration of damaged corneal tissue as effectively as tissue specific LMSCs. A significant part of the studied therapies with the use of MSCs was based on their local administration without disturbing the continuity of the eyeball wall, or on periorbital injections and intravenous administration. Due to the histophysiology of the cornea, intraocular application of MSCs has proven to be a risky procedure with no significant expected benefits for corneal treatment. The above facts and the need to maintain sufficiently long and close contact between the transplanted LMSCs and the damaged corneal bed result in the need to use a carrier that enables cell adhesion and migration. The substrate should also provide growth-stimulating factors, such as organic compounds or physical stimuli, and enable the diffusion of nutrients and other produced substances, as well as maintain appropriate mechanical and physicochemical parameters, conducive to integration and further development of the tissue.

Research on cell therapies in medicine has been conducted for over a quarter of a century, but despite the intensive, long-term involvement of scientific institutions, there is only one patented ATPM (Advanced Therapy Medicinal Product) approved in 2015 by the European Medicines Agency is Holoclar.

Veterinary medicine struggling with similar problems in corneal therapy is looking for its way in the field of regenerative therapies in cases of damage, degenerative changes and corneal scars as well as permanent damage to the limbus.

The aim of this study was to evaluate the clinical and technological possibilities of developing a method of obtaining limbal stem cells from a domestic dog (*Canis lupus familiaris*) and a cat (*Felis catus*) and stabilizing a homogeneous layer of limbal stem cells on a substrate that allows their transfer and maintenance on the treated surface of the cornea.

The assumption was also to obtain fast adhesion of cells to the growth surface, regardless of the quantity and quality of the material, and to obtain proliferating cells of the primary culture for a minimum of 90% isolation within 72 hours. The substance used must have meet legal requirements for pharmaceutical raw materials. Previous experience indicated poor adhesion of isolated cells and explants to standard cells growth areas, and the process was usually long (about 2 weeks) and characterized by low repeatability.

Therefore, the aim of the research work was to modify the growth surface in order to obtain fast adhesion of explants and cell migration to the growth surface.

As part of the conducted research, we obtained a fully reproducible method of producing tissue engineering prototype in the form of autologous LMSCs on a collagen membrane formed in the shape of a contact lens ready for implantation in a patient.

Our research has shown that the collected fragments of the limbus containing LCMS, transported to the laboratory for up to 72 hours, are a good starting material for the isolation and multiplication of LMSCs.

During the study, the limbus was isolated from 20 patients: including 8 cats (5 females and 3 males) and 12 dogs (6 females and 6 males). In the group of cats, the age of the donors ranged from 3 to 20 years. The youngest dog was 10 months old and the oldest 16 years old. Some of the donors (8 dogs and 1 cat) were undergoing ophthalmological treatment, which ended in enucleation due to the severity of the process. In two cases (1 cat and 1 dog) the limbus was taken from the patient immediately after mechanical trauma to the eyeball. In 3 cases (2 dogs and 1 cat), the limbus was taken from patients diagnosed with tumors within the eyeball. In one case (1 cat), the eye from which the limbus was taken showed signs of post-inflammatory atrophy (extensive changes in the cornea and reduction of the eyeball size). One of the cats had symptoms of Infectious Peritonitis (FIP) at the time of the limbus retrieval. Cardiac problems of varying degrees were found in 4 dogs. In 4 donors (4 dogs) in the history of treatment there was a neoplastic disease unrelated to ophthalmic symptoms (in 2 dogs the active phase of extra-ophthalmological neoplastic disease).

The research also allowed to conclude that it is possible to collect, multiply and stabilize LMSCs obtained from elderly patients and from patients whose donor eye was affected by a disease process such as glaucoma and an extensive corneal ulcer on a collagen substrate.

The studies showed that the quality of the cellular material was not significantly affected by extra-ocular diseases occurring in the donors at the moment of limbal fragment collection. The next step will be the introduction of the cell engineering prototype we have developed as part of an experimental therapy.