

Innowacyjna metoda leczenia ostrego uszkodzenia wątroby z wykorzystaniem komórek owodni wyizolowanych z łożyska ludzkiego.

Badania nad mechanizmami hepatotoksyczności i nowymi terapiami wątroby uszkodzonej przez leki, toksyny, wirusy lub w wyniku chorób autoimmunologicznych mają duże znaczenie aplikacyjne, co wynika z ograniczonej skuteczności dotychczas stosowanych metod leczniczych, dużej liczby osób oczekujących na transplantację narządu, wysokich kosztów leczenia oraz dożywotniej konieczności przyjmowania leków immunosupresyjnych. Jednym z takich schorzeń jest ostra niewydolność wątroby (ALF; ang. Acute Liver Failure), definiowana jako rozległa martwica hepatocytów i charakteryzująca się śmiertelnością średnio na poziomie 50%. Na etapie badań przedklinicznych odpowiednim modelem eksperymentalnym indukcji ALF jest intoksykacja zwierząt doświadczalnych związkiem hepatotoksycznym D-galaktozaminą (D-GalN). Jej działanie imituje też uszkodzenie wywołane przez ludzkie wirusy zapalenia wątroby, których nie da się bezpośrednio zastosować w modelu zwierzęcym.

Obecnie stosowana terapia ALF jest w dużej mierze wspomagająca. Głównym jej celem jest przewidywanie, zapobieganie i leczenie powikłań oraz ułatwienie regeneracji wątroby pacjenta. Dość skuteczną formą leczenia ALF jest przeszczepienie wątroby lub samych hepatocytów, jednak w obu przypadkach, jednym z kluczowych problemów jest ich dostępność. Badania nad wpływem mezenchymalnych komórek macierzystych w chorobach takich jak ALF wskazuje na możliwość poprawy parametrów wątroby, jednak izolacja komórek ze szpiku kostnego jest niewystarczająca, inwazyjna i bolesna dla pacjenta. Obecnie tylko jedno badanie kliniczne z wykorzystaniem komercyjnych komórek macierzystych jest zarejestrowane na ClinicalTrials.com do leczenia ALF. Nieliczne publikacje opisujące rolę terapii komórkowej w leczeniu tej choroby skupiają się na komórkach mezenchymalnych, ale ograniczenia w stosowaniu tych komórek motywują do poszukiwania dalszych alternatyw. Alternatywną formą leczenia może okazać się terapia z zastosowaniem ludzkich nabłonkowych komórek owodni ludzkiej (hAEC, ang. human Amniotic Epithelial Cells), które mają duży potencjał różnicowania, charakteryzują się niskim profilem immunogennym, wydzielają czynniki hamujące stan zapalny, a w przeciwieństwie do wielu innych komórek macierzystych nie tworzą guzów nowotworowych po przeszczepie. Ich pozyskiwanie z łożyska, w porównaniu z komórkami izolowanymi z innych tkanek ludzkich jest bardziej wydajne, bezpieczne i nie budzi kontrowersji etycznych. Dotychczasowe badania wskazują na znaczny potencjał terapeutyczny komórek owodniowych, jednak nie określono jego związku z biodystrybucją migrujących komórek.

W związku z tym postawiono hipotezę, że komórki wyizolowane z ludzkiej owodni i podawane doświadczonowo w ramach terapii komórkowej myszom-biorcom intoksykowanym D-galaktozaminą mogą skutecznie zasiedlać wątrobę i hamować proces uszkodzenia wątroby. Wieloetapowa ocena uszkodzenia wątroby (RT-PCR, immunocytochemia, ocena histopatologiczna) pomoże określić zależność między skutecznością podania wstrzykniętych komórek a efektem terapeutycznym, jaki wywołały. Zastosowanie dwóch innowacyjnych metod identyfikacji hAEC (DNA oraz markery komórek ludzkich) zwiększy prawdopodobieństwo wykrycia przeszczepionych hAEC w narządach i krwi myszy biorecy, nawet jeśli ich liczba będzie bardzo mała.

Doświadczenia zostaną przeprowadzone na dojrzałych samicach myszy szczepu BALB/c. Myszy zdrowe zostaną podzielone na dwie grupy otrzymujące jednorazowe iniekcje, odpowiednio: placebo; oraz hAEC doświadczonowo. Myszy poddane dootrzewnowej intoksykacji D-GalN zostaną podzielone na kolejne dwie grupy, z których jedna otrzyma jednorazowo hAEC. Następnie, po 3, 21 i 69 godzinach od podania hAEC oraz po 6, 24 i 72 godzinach od podania D-GalN od myszy-biorców zostaną pobrane narządy (mózg, płuca, śledziona, wątroba, serce, nerki) i krew. Stopień uszkodzenia wątroby będzie określony na podstawie oceny liczby komórek proliferujących (Ki-67<sup>+</sup>) i apoptycznych (Kaspaza-3<sup>+</sup>), zmian histopatologicznych (barwienie hematoksyliną-eozyną) a także poprzez badanie parametrów krwi i ekspresji genów stresu oksydacyjnego. Dodatkowo, biodystrybucja podanych iniekcyjnie hAEC zostanie oceniona metodą immunohistochemiczną (identyfikacja białek: NuMa, CK14, B7H3) i reakcją łańcuchową polimerazy (identyfikacja genów: AlyY8b, cytochrom B).

Nowością prezentowanego eksperymentu jest zastosowanie hAEC do leczenia ostrego uszkodzenia wątroby co nie zostało dotychczas zbadane. Ten model eksperymentalny nie był dotychczas używany do oceny potencjału hAEC jako terapii przedklinicznej. Nie badano również związku między liczbą podanych komórek, liczbą wszczepionych komórek i ich efektem terapeutycznym. Uzyskanie takich danych ułatwiłoby zaplanowanie skutecznego leczenia klinicznego ALF w oparciu o podanie pacjentowi hAEC.