

Streszczenie doktoratu mgr Joanny Chociey-Stypulkowskiej

„Ocena dojrzałości komórek CD34+ stosowanych w przeszczepach autologicznych w powiązaniu ze skutecznością leczenia rozległych ubytków chrzęstno-kostnych powierzchni stawowych.”

Leczenie zmian chrzęstno-kostnych jest wielkim wyzwaniem w dziedzinie medycyny, a regeneracja jest niezwykle złożonym procesem naprawczym. W początkowych stadiach najczęściej stosuje się odciążenie stawu i niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ). Niestety wraz z nasileniem objawów oraz zwiększeniem rozległości ubytku bierze się pod uwagę leczenie operacyjne. Przy niewielkich ubytkach wystarczy artroskopowe oczyszczenie ubytku z zastosowaniem techniki mikrozłamań. Przy rozległych zmianach, coraz częściej sięga się po metody medycyny regeneracyjnej, zwłaszcza z wykorzystaniem przeszczepów autologicznych komórek izolowanych z krwi pacjenta.

Celem podjętych badań była ocena dojrzałości komórek CD34+ stosowanych w przeszczepach autologicznych w powiązaniu ze skutecznością leczenia rozległych ubytków chrzęstno-kostnych powierzchni stawowych.

Materiał badany stanowił koncentrat komórek powstających w szpiku pod wpływem działania G-CSF otrzymany metodą aferezy przy użyciu separatorów krwi MSC, pobierany od 50 pacjentów (32 mężczyźni, wiek 24-67 i 18 kobiet w wieku 28- 65) leczonych w szpitalu o profilu ortopedyczno-chirurgicznym NZOZ Human Medica Omeda. Próbkę pobrano po uzyskaniu pisemnej świadomej zgody, zgodnie z zasadami protokołu helsińskiego. Projekt badań uzyskał akceptację Komisji Bioetycznej przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Białymstoku numer OIL/K.B.-442/2018.

Aby zrealizować cel oceniliśmy ilościowo i jakościowo komórki obecne w zawiesinie (koncentracje), otrzymanym metodą aferezy przy użyciu separatorów krwi MSC, po wcześniejszym podaniu podskórnie czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytarnych, wykonując rozmaz, który zabarwiono metodą Maya- Grünwalda- Giemsy (MGG) i oceniono przy użyciu mikroskopu świetlnego BX41 oraz określono ekspresję antygenów powierzchniowych, cytoplazmatycznych i stężenie cytokin metodą fluorescencji bezpośredniej przy użyciu cytometru przepływowego (Canto II, Becton Dickinson BD)

Do analizy statystycznej wyników wykorzystano program STATISTICA 12. Do zweryfikowania normalności wykorzystano test Shapiro-Wilka. Dane wykazujące rozkład normalny przedstawiono jako wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym. Dane

liczbowe nie wykazujące rozkładu normalnego zostały przedstawione jako mediana z podanym zakresem wartości minimalnej i maksymalnej.

Na podstawie wyników badań sformułowano 7 wniosków. Podanie pacjentom czynnika wzrostu kolonii granulocytarnych G-CSF doprowadziło do wzrostu komórek należących do układu granulocytarnego, które stanowiły około 40% analizowanych komórek. Najbardziej cennymi komórkami w leczeniu ubytków chrzęstno-kostnych są mezenhymalne komórki zrębu MSC CD45 i CD34 ujemne, charakteryzujące się obecnością CD44, CD90, CD105. W analizowanych zawiesinach otrzymanych metodą aferezy przy użyciu separatorów krwi HSC stanowiły 2,1% (0,67- 10%). Ilość hematopoetycznych komórek szpiku HSC z bardzo wysoką ekspresją CD45+ i CD34+, stanowiła 4,5% i mieściła się w przedziale 1,45- 12,8%. Komórki z wysoką ekspresją CD34 zostały podzielone ze względu na ekspresję antygenów charakterystycznych dla poszczególnych linii komórkowych: prekursorzy limfocytów T o fenotypie CD45+, CD2+, cytCD3+, CD5+, CD7+, TdT+ stanowiły 7,45% (6,75- 8,1%); prekursorzy limfocytów B opisane ekspresją CD45+, CD19+, CD10+, TdT+ mieściły się w zakresie 1,8- 2,5%, mediana 2,2%; prekursorzy monocytów o immunofenotypie CD45+, CD64+, CD13+, CD33+ to populacja, która stanowiła 8,35% (7- 10%). Komórki dojrzałe, bez ekspresji CD34, tworzyły populację: limfocytów T opisanych fenotypem CD45+, CD2+, cytCD3+, CD3+, CD5+, CD7+ stanowiły 16,85% komórek (12,25-18,5%); limfocytów B CD45+, CD19+, CD20+, CD22+ mieściły się w granicach 3-4,9%, mediana 4,25%; monocytów CD45+, CD14+, CD64+, CD13+, CD33+, MPO+, CD16+ stanowiły 10,1% (5,3- 15,4%). Analizowane komórki wydzielają cytokiny, z których najwyższe stężenie odnotowano w przypadku IL-17A (86,3 pg/mL), kolejna to IL-6 (72,76 pg/mL), zbliżone stężenia miały IL-2, INF, IL-8, IL-10, najniższe IL-1 β i IL-12p70. Zastosowanie u pacjentów zakwalifikowanym do zabiegu, przeszczepienia komórek osadzonych na biowchłanialnej matrycy i komórek kości gąbczastej w miejsce rozległych ubytków chrzęstno-kostnych powierzchni stawowych stawu kolanowego, koncentratu składającego się z tak różnorodnej mieszaniny komórek znacząco poprawiło funkcjonalność kolana (z 30% przed zabiegiem do 85% po) . Przyczyniło się to do wzrostu satysfakcji z efektów zabiegu (oceniane na 8-10), klinicznej poprawy zgięcia, pełnego wyprost i prawidłowego wzorca chodu. Testy Wilsona, Apley'a i Thesally'ego były ujemne u 75% zgłaszających się pacjentów, natomiast w teście Zahlena wynik dodatni stwierdzono u 75% pacjentów. W badaniu palpacyjnym jedynie u 15% stwierdzono ból.