



Zavod Republike Slovenije
za transfuzijsko medicino
Slovenian Institute for Transfusion Medicine

70

Raziskovalni dan 2025

ZBORNİK POVZETKOV

ZAVOD REPUBLIKE
SLOVENIJE ZA
TRANSFUZIJSKO MEDICINO

ŠLAJMERJEVA 6,
1000 LJUBLJANA

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

COBISS.SI-ID 238440195

ISBN 978-961-6596-25-1 (PDF)

Raziskovalni dan 2025 Zbornik povzetkov

Urednik:

izr. prof. dr. Elvira Maličev, univ. dipl. biol.

Ana Kolenc, mag. bioteh.

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino

Založba:

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino, Ljubljana

Ljubljana, 2025

Dostopnost: <http://www.ztm.si/raziskave-razvoj-izobrazevanje/razvojna-in-raziskovalna-dejavnost/publikacije/leto-2025/>

Kazalo

PROGRAM SREČANJA	5
INTERNI RAZISKOVALNI IN RAZVOJNI PROJEKTI	7
dr. Tadeja Dovč Drnovšek: Uvedba presejevalnega testa na nivoju transkriptoma mezenhimskih stromalnih matičnih celic z uporabo qPCR	8
dr. Sendi Montanič, Katja Rotar: Ovrednotenje vsebnosti in specifičnosti citotoksičnih protiteles anti-HLA v serumih bolnikov po presaditvi organov	10
dr. Katrina Hartman: Razvoj in uvedba testa sterilnosti za tkivo popkovnice	12
Kaja Zajc, dr. Nataša Tešić: Razvoj funkcijskega testa za trorodno diferenciacijo mezenhimskih stromalnih matičnih celic (MSC)	14
asist. Primož Poženel: Ex vivo priprava MSC in njihova uporaba v klinični raziskavi zdravljenja osteoartritisa kolena	16
izr. prof. dr. Elvira Maličev, Irma Hostnik: Uvedba laboratorijskih postopkov za določanje zunajceličnih veziklov v krvnih komponentah krvodajalcev	18
prof. dr. Urban Švajger, asist. Primož Poženel: Pilotna (akademska) študija zdravljenja kserostomije z alogenskimi mezenhimskimi stromalnimi matičnimi celicami	20
Boštjan Smrekar: Spektrofotometrično določanje celokupnega prostega hemoglobina v plazmi na aparatu BioTek Epoch – uvedba nove metode	22
Ana Milojković: Optimizacija afereznih postopkov na Centru za afereze OTS	24

NACIONALNI IN MEDREGIONALNI RAZISKOVALNI PROJEKTI TER RAZISKOVALNI PROGRAM	26
izr. prof. dr. Elvira Maličev: Učinkovitost mezenhimskih matičnih celic in zunajceličnih veziklov za obnovo roženičnega tkiva	27
prof. dr. Urban Švajger: Razvoj novih nizkomolekularnih modulatorjev Tollu podobnih receptorjev 7	29
dr. Valerija Kovač: Inducibilno programiranje intrinzičnih lastnosti celic CAR T za imunoterapijo raka	31
dr. Valerija Kovač: Inovativna imunoterapija raka preko CAR T celic (CARRS)	32
mag. Marko Cukjati: IMMUNOCLUSTER-2 Uvedba klinične študije z naprednim celičnim zdravilom aHyC na medregionalni ravni	33
prof. dr. Vladka Čurin Šerbec: Sintezna biologija in imunologija (JARD RS)	36
MLADI RAZISKOVALCI	38
Andrej Kobold: Modifikacija mezenhimskih stromalnih matičnih celic iz popkovnice z namenom izboljšanja imunomodulatornih in regenerativnih lastnosti pri zdravljenju artroze	39
Petra Kern: Razvoj monoklonskih protiteles proti membranskim proteinom	41

RAZISKOVALNI DAN

Zavod Republike Slovenije za
transfuzijsko medicino



Zavod Republike Slovenije
za transfuzijsko medicino
Slovenian Institute for Transfusion Medicine



1. del raziskovalnega dneva bo potekal
22. maja 2025,
ob 9.00 v knjižnici ZTM.

Organizacija:

izr. prof. dr. Elvira Maličev, univ. dipl. biol.
in Ana Kolenc, mag. bioteh.

Služba za razvojno in raziskovalno dejavnost

PROGRAM (1. DEL) INTERNI PROJEKTI

9.05-9.15	dr. Tadeja Dovč Drnovšek, univ. dipl. biol.	Uvedba presejevalnega testa na nivoju transkriptoma mezenhimskih stromalnih matičnih celic z uporabo qPCR
9.15-9.25	dr. Sendi Montanič, univ. dipl. biokem.	Ovrednotenje vsebnosti in specifičnosti citotoksičnih protiteles anti-HLA v serumih bolnikov po presaditvi organov
9.25-9.35	dr. Katrina Hartman, mag. farm.	Razvoj in uvedba testa sterilnosti za tkivo popkovnice
9.35-9.45	prof. dr. Primož Rožman, dr. med., spec. transf. med. (namesto dr. Maje Grundner)	Primerjava treh testov za potencialno vpeljavo novega testa za detekcijo HIT protiteles
9.45-9.55	prof. dr. Primož Rožman, dr. med., spec. transf. med.	Kvantitativno določanje protiteles anti-HPA-1a pri nosečnicah
9.55-10.05	dr. Nataša Tešić, univ. dipl. mikrobiol. (namesto Kaje Zajc)	Razvoj funkcijskega testa za trorodno diferenciacijo mezenhimskih stromalnih matičnih celic (MSC)
10.05-10.15	asist. Primož Poženel, dr. med., spec. transf. med.	Ex vivo priprava MSC in njihova uporaba v klinični raziskavi zdravljenja osteoartritisa kolena
10.15-10.25	izr. prof. dr. Elvira Maličev, univ. dipl. biol.	Uvedba laboratorijskih postopkov za določanje zunajceličnih veziklov v krvnih komponentah krvodajalcev
10.25-10.35	asist. Primož Poženel, dr. med., spec. transf. med. (namesto prof. dr. Urbana Svajgerja)	Pilotna (akademska) študija zdravljenja kserostomije z alogenskimi mezenhimskimi stromalnimi matičnimi celicami
10.35-10.45	Irma Hostnik, mag. okolj. ved (namesto Boštjana Smrekarja)	Spektrofotometrično določanje celokupnega prostega hemoglobina v plazmi na aparatu BioTek Epoch – uvedba nove metode
10.45-10.55	Ana Milojković, dr. med., spec. tranf. med.	Optimizacija afereznih postopkov na Centru za afereze OTS

RAZISKOVALNI DAN

Zavod Republike Slovenije za
transfuzijsko medicino



Zavod Republike Slovenije
za transfuzijsko medicino
Slovenian Institute for Transfusion Medicine



2. del raziskovalnega dneva bo potekal
28. maja 2025,
ob 9.00 v knjižnici ZTM.

Organizacija:

izr. prof. dr. Elvira Maličev, univ. dipl. biol.
in Ana Kolenc, mag. bioteh.

Služba za razvojno in raziskovalno dejavnost

PROGRAM (2. DEL) RAZISKOVALNI PROJEKTI (ARIS)

9.05-9.15

izr. prof. dr. Elvira Maličev,
univ. dipl. biol.

Učinkovitost mezenhimskih matičnih celic in
zunajceličnih veziklov za obnovo roženičnega tkiva

9.15-9.25

prof. dr. Vladka Čurin
Šerbec, univ. dipl. kem.

Inducibilno programiranje intrinzičnih lastnosti
celic CAR T za imunoterapijo raka

9.25-9.35

prof. dr. Vladka Čurin
Šerbec, univ. dipl. kem.

Inovativna imunoterapija raka preko CAR T celic
(CARRS)

MEDREGIONALNI PROJEKTI

9.35-9.45

mag. Marko Cukjati,
dr. med., spec. transf. med.

IMMUNOCLUSTER-2 Uvedba klinične študije z
naprednim celičnim zdravilom aHyC na
medregionalni ravni

RAZISKOVALNI PROGRAM

9.45-9.55

prof. dr. Vladka Čurin
Šerbec, univ. dipl. kem.

Sintezna biologija in imunologija (JARD RS)

MLADI RAZISKOVALCI

9.55-10.05

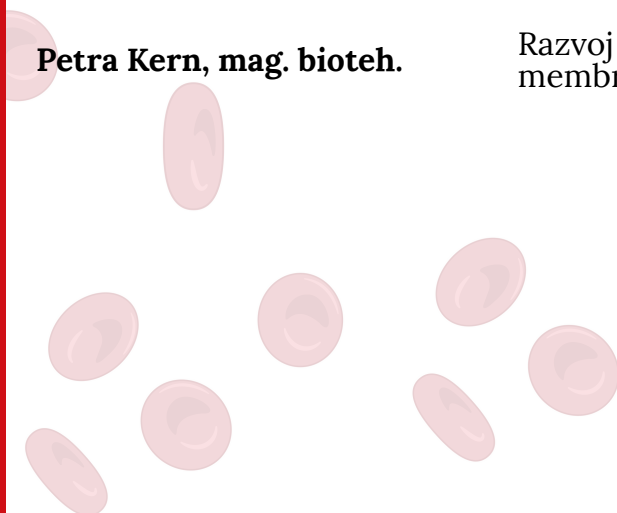
Andrej Kobold, mag. farm.

Modifikacija mezenhimskih stromalnih matičnih
celic iz popkovnice z namenom izboljšanja
imunomodulatornih in regenerativnih lastnosti pri
zdravljenju artroze

10.05-10.15

Petra Kern, mag. bioteh.

Razvoj monoklonskih protiteles proti
membranskim proteinom



Interni raziskovalni in razvojni projekti

1. Uvedba presejevalnega testa na nivoju transkriptoma mezenhimskih stromalnih matičnih celic z uporabo qPCR
2. Ovrednotenje vsebnosti in specifičnosti citotoksičnih protiteles anti-HLA v serumih bolnikov po presaditvi organov
3. Razvoj in uvedba testa sterilnosti za tkivo popkovnice
4. Razvoj funkcijskega testa za trorodno diferenciacijo mezenhimskih stromalnih matičnih celic (MSC)
5. Ex vivo priprava MSC in njihova uporaba v klinični raziskavi zdravljenja osteoartritisa kolena
6. Uvedba laboratorijskih postopkov za določanje zunajceličnih veziklov v krvnih komponentah krvodajalcev
7. Pilotna (akademska) študija zdravljenja kserostomije z alogenskimi mezenhimskimi stromalnimi matičnimi celicami
8. Spektrofotometrično določanje celokupnega prostega hemoglobina v plazmi na aparatu BioTek Epoch – uvedba nove metode
9. Optimizacija afereznih postopkov na Centru za afereze OTS

Uvedba presejevalnega testa na nivoju transkriptoma mezenhimskih stromalnih matičnih celic z uporabo qPCR

SODELUJOČI: ANDREJ KOBOLD, PROF. DR. URBAN ŠVAJGER, DR. ANA BAJC ČESNIK, DR. POLONA KLEMENC

Kontrola kakovosti zdravil za napredno zdravljenje (ZNZ) na osnovi mezenhimatskih stromalnih matičnih celic (MSC) iz tkiva popkovnice je izrednega pomena, saj želimo pripraviti varne in učinkovite celične terapevtske produkte, ki naj bo bili za vsakega pacienta čimbolj homogene in definirane kakovosti. Že sam začetni material in način gojenja posledično vplivata na sestavo zdravil, pripravljenih iz MSC. MSC svoje terapevtske lastnosti izražajo preko zelo velikega števila topnih in površinsko vezanih dejavnikov, ki lahko delujejo regenerativno in imunomodulatorno.

Laboratorijsko analizo ZNZ na osnovi MSC smo v sklopu projekta želeli izvesti na podlagi izražanja posameznih genov z metodo PCR v realnem času (qPCR), ki je zanesljiva in občutljiva metoda, ki omogoča hkratno relativno hitro analizo izražanja večjega števila genov.

Glavni cilj projekta je vzpostavitev presejalne metode, s katero bi lahko na nivoju genskega izražanja definirali lastnosti MSC, ki so najbolj ključne pri njihovem delovanju pri specifičnih bolezenskih indikacijah.

Na podlagi rezultatov iz leta 2023 smo v nadaljevanju študije preverili vpliv posameznih citokinov in rastnih dejavnikov na izražanje 5 referenčnih in 15 regenerativnih in imunomodulatornih genov (TGFB1, TGFB2, TGFB3, HGF, PTGS2, FGF2, FGF18, TNFAIP6, DKK1, TIMP1, THBS2, SCT1, IGF1, IL10, IDO1) v kulturi MSC. V osnovi smo opravili tri različne eksperimente, pri čemer smo vsak eksperiment ponovili s tremi različnimi donorji MSC.

V prvem eksperimentu smo testirali 14 vzorcev kulture MSC – en vzorec je bil netretiran, 13 vzorcev smo tretirali s posameznimi citokini/rastnimi faktorji (BMP2, BMP4, BMP7, IGF1, HGF, IFN γ , TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3, IL1 β , Oncostatin M (OSM), TNF α , FGF2). Na podlagi rezultatov smo izbrali pet dejavnikov (BMP2, IL1 β , OSM, TGF β 1 in FGF2), ki so pozitivno modilirali izražanje največ tarčnih genov. Opazili smo tudi, da se pri z IFN γ modificiranimi MSC pričakovano inducira izražanje njihovega glavnega imunomodulatornega encima IDO1, vendar pa se zniža izražanje večine preostalih tarčnih genov.

V nadaljevanju nas je zanimalo, ali lahko s kombinacijo IFN γ z drugimi dejavniki ohranimo izražanje IDO1 in induciramo druge regenerativne gene, ki jih IFN γ negativno regulira.

V drugem eksperimentu smo testirali 12 vzorcev – en vzorec je bil netretiran, šest vzorcev smo tretirali s posameznimi citokini/rastnimi faktorji (BMP2, IFN γ , TGF β 1, IL1 β , OSM, FGF2), pet vzorcev smo tretirali s kombinacijami citokinov/rastnih faktorjev (IFN γ +BMP2, IFN γ +TGF β 1, IFN γ +IL1 β , IFN γ +OSM, IFN γ +FGF2). Ugotovili smo, da v primerjavi z modifikacijami s posameznimi dejavniki njihov dodatek k IFN γ le delno vpliva na izražanje tarčnih genov. Po drugi strani pa dodani posamezni citokini/rastnih faktorji k IFN γ vplivajo tudi na izražanje IDO1, in sicer je bilo izražanje IDO1 zvišano pri kombinaciji BMP2 in IFN γ , pri ostalih kombinacijah pa je bilo znižano, kar je nezaželeno iz vidika imunomodulatornih lastnosti MSC.

V nadaljevanju nas je zanimalo, ali lahko z različnimi kombinacijami citokinov/rastnih faktorjev (BMP2, IL1 β , OSM in TGF β 1) še bolj induciramo tarčne gene.

V tretjem eksperimentu smo testirali 16 vzorcev – en vzorec je bil netretiran, štiri vzorce smo tretirali s posameznimi citokini/rastnimi faktorji (BMP2, TGF β 1, IL1 β , OSM), šest vzorcev smo tretirali s kombinacijo dveh dejavnikov (BMP2+IL1 β , BMP2+OSM, BMP2+TGF β 1, IL1 β +OSM, IL1 β +TGF β 1, OSM+TGF β 1), štiri vzorce s tremi dejavniki (BMP2+IL1 β +OSM, BMP2+IL1 β +TGF β 1, BMP2+OSM+TGF β 1, IL1 β +OSM+TGF β 1) in en vzorec štirimi dejavniki (BMP2+IL1 β +OSM+TGF β 1). Ugotovili smo, da določeno sinergistično delovanje obstaja. Na podlagi podatkov smo modifikacije z različnimi kombinacijami citokinov/rastnih faktorjev razvrstili glede na indukcijo tarčnih genov in izbrali »najboljše« kombinacije (IL1 β +TGF β 1, OSM+TGF β 1, BMP2+IL1 β +TGF β 1 in BMP2+OSM+TGF β 1). Slednje želimo v prihodnosti ovrednotiti tudi z dodatnimi metodami (npr. pretočno citometrijo, testi ELISA, regenerativnimi in imunomodulatornimi funkcijskimi testi).

Statistično značilno spremembo v izražanju tarčnih genov pod vplivom posameznih citokinov/rastnih faktorjev in njihovih kombinacij bomo ovrednotili z analizo podatkov z uporabo zahtevnejših statističnih metod.

Ovrednotenje vsebnosti in specifičnosti citotoksičnih protiteles anti-HLA v serumih bolnikov po presaditvi organov

SODELUJOČI: DR. BLANKA VIDAN JERAS

Eden od glavnih vzrokov za izgubo presadka je zavrnitev s protitelesi. Pri bolnikih po presaditvi organa zato določamo prisotnost protiteles anti-HLA, specifično usmerjenih proti neskladnim antigenom darovalca (DSA). V zadnjem desetletju je prišlo do velikega tehnološkega napredka pri določanju in opredelitvi anti-HLA protiteles, kar je omogočilo boljše razumevanje vloge aloprotiteles in zavrnitve alogenskih presadkov. Luminex single antigen test (SAB) omogoča semi-kvantitativno določanje za darovalca specifičnih anti-HLA (DSA) protiteles z visoko ravni občutljivosti in specifičnosti. Vemo pa, da pa pri vseh bolnikih z DSA ne pride do zavrnitve presadka. Ena od ključnih značilnosti anti-HLA DSA je njihova sposobnost preklapljanja med razredi protiteles in aktivacije komplementa. Test SAB zazna vse podrazrede IgG, ne glede na njihovo zmožnost aktivacije komplementa. Na podlagi predvidevanja, da tista protitelesa, ki najmočneje vežejo komplement (IgG1 in IgG3), tudi najverjetneje povzročijo zavrnitev, so test SAB spremenili tako, da določa samo tista protitelesa, ki vežejo C1q, prvo komponento aktivacije komplementa. Prognostična vloga anti-HLA protiteles, specifičnih za darovalca (anti-HLA DSA) je predmet raziskave številnih študij, ki preučujejo rezultate presaditev čvrstih organov z namenom ugotavljanja povezave med rezultati obeh testov in kliničnim potekom. V okviru internega projekta smo ovrednotili vsebnosti in specifičnosti citotoksičnih protiteles anti-HLA v serumih bolnikov dobljene s tremi različnimi metodami, in sicer SAB, SAB-C1q in limfocitotoksičnim testom (CDC).

Opravili smo testiranje citotoksičnosti protiteles 12 serumskih vzorcev kontrol EPT 2024 A-L s testom SAB-C1q. Za testiranje ravno teh vzorcev smo se odločili, ker imamo v okviru zunanjšega preverjanja naše usposobljenosti že opravljena testiranja teh serumov s testoma CDC in SAB. Pri testu SAB-C1q izziv ni v sami izvedbi testa, ampak predvsem v njegovi interpretaciji. "Cut-off" vrednosti postavi laboratorij sam, prav tako ni sprejetih kriterijev sprejemljivosti testa (vrednosti MFI pozitivne (PC) in negativne kontrole (NC)).

S primerjavo naših rezultatov z rezultati, posredovanimi iz 20 tujih centrov, ki so prav tako kot mi poročali rezultate svojih testiranj v okviru kontrol EPT, smo želeli ugotoviti, ali je naša interpretacija rezultatov pravilna (znotraj konsenza). Ugotovili

smo, da smo poročali vse specifičnosti, za katere je bil dosežen konsenz, ter da nismo poročali nobene specifičnosti, za katere konsenz ni bil dosežen. Pri serumih, kjer so vrednosti PC in NC bistveno odstopale od naših kriterijev, ni bilo doseženega konsenza za nobeno specifičnost, zato sklepamo, da so imeli pri istih vzorcih težave tudi ostali laboratoriji.

Primerjave rezultatov testiranja s testom SAB-C1q z rezultati testiranj s testoma SAB in CDC so glede na že opravljeno validacijo pokazale pričakovane ugotovitve. S testom SAB-C1q smo dokazali specifičnost vseh tistih protiteles, ki so pozitivne v testu CDC, in le nekatere od specifičnosti, ki smo jih dokazali s testom SAB. Poleg tega smo želeli ugotoviti, ali lahko na podlagi vrednosti MFI v testu SAB sklepamo na rezultat citotoksičnosti v testu SAB-C1q. Zaključimo lahko, da višji MFI v SAB (zlasti če je $MFI > 15000$) predstavlja večjo verjetnost, da bo SAB-C1q poz, ni pa to vedno nujno. Dokazali smo namreč tudi specifičnosti v SAB z MFI 20000, ki pa so v SAB-C1q negativne.

V letošnjem letu nameravamo v sodelovanju s KO za kardiologijo UKC Ljubljana test SAB-C1q klinično ovrednotiti še pri bolnikih po presaditvi srca in sumom na humoralno zavrnitev organa.

Razvoj in uvedba testa sterilnosti za tkivo popkovnice

SODELUJOČI: SARA PLASKAN, BOŠTJAN SMREKAR, PROF. DR. URBAN ŠVAJGER

Proizvodnja zdravil za napredno zdravljenje sledi smernicam dobre proizvodne prakse (angl Good Manufacturing Practice, GMP). GMP med drugim zahteva nadzor nad vhodnim materialom. Ključni vhodni material pri proizvodnji celičnih pripravkov iz mezenhimskih stromalnih matičnih celic je popkovnica.

Ena bistvenih preiskav tkiva popkovnice pred obdelavo je preiskava na sterilnost. Na ZTM imamo vzpostavljen sistem BACTEC FX za preizkušanje vzorcev na sterilnost. Sistem sestoji iz stekleničk z gojiščem, ki jih nacepimo z določenim volumnom vzorca, in aparature, v kateri se nacepljene stekleničke inkubirajo. Aparatura med inkubacijo zazna morebiten porast mikroorganizmov (MO).

Stekleničke z gojiščem so oblikovane tako, da se vzorci nacepijo z iglo. Zato morajo biti vzorci pripravljeni tako, da lahko z iglo vzorčimo v brizgo določen volumen. Tkivo popkovnice moramo homogenizirati do ustreznega homogenata (suspenzije), da ga lahko injiciramo.

S homogenizatorjem gentleMACS Dissociator (Miltenyi) lahko pripravljamo homogenate različnih tkiv v zaprtem sistemu. Tako pripravljene vzorce lahko preizkušamo na sterilnost. Homogeniziranje je možno na dva načina – pri enem uporabimo encimsko razgradnjo in nastavke za homogenizacijo C Tubes (Miltenyi), pri drugem pa samo nastavke za homogenizacijo M Tubes (Miltenyi). Slednji način je bistveno hitrejši in cenejši.

Priprava tkiva popkovnice poteka po ustaljenem postopku v aseptičnih pogojih. Približno 10 cm popkovnice speremo s fosfatnim pufrom in jo narežemo na manjše koščke (okoli 5 mm). Po 50 koščkov skupaj prenesemo v 50 ml centrifugirko in dolijemo pufer do 10 ml. Pripravimo 10 ml zamrzovalne raztopine (20 % dimetil sulfoksida v pufru). Zamrzovalno raztopino dodamo k tkivu in centrifugirke do uporabe zamrznemo pri -80 °C.

Pred uporabo tkivo popkovnice odtalimo. V aseptičnih pogojih vsebino centrifugirke prelijemo preko sita (100 µm). V drugo centrifugirko zatehtamo okoli 0,5 g tkiva in dodamo 5 ml pufra ter pustimo 1 minuto. Spet prelijemo preko sita in tkivo in prenesemo v M Tube. Dolijemo do 5 ml fosfatnega pufra, M Tube namestimo na homogenizator in zaženemo izbrani program homogeniziranja.

Homogenizacijo ponovimo trikrat. Pripravljen homogenat v aseptičnih pogojih prelijemo čez sito v centrifugirko. Ostanke na situ zavržemo, homogenat pa nacepimo v stekleničke za preizkušanje na sterilnost (Bactec Plus Aerobic/F gojišče za aerobne MO in Bactec Lytic10 Anaerobic gojišče za anaerobne MO) po 1 ml v vsako. Stekleničke na sterilnost preizkušajo v sistemu Bactec (Laboratoriju za končno kontrolo kakovosti krvnih komponent).

Ustreznost gojišč za rast mikroorganizmov so potrdili v Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano v Novem mestu. V Evropski farmakopeji predpisanih 5 mikroorganizmov se je ustrezno razraslo tako v samih gojiščih kot tudi v stekleničkah z dodanim homogenatom. To pomeni, da homogenat ne zavira rasti MO in da je primeren za preizkušanje sterilnosti v sistemu Bactec.

Pokazali smo tudi, da bi sistem zaznal okuženo tkivo popkovnice. Za spiranje tkiva po odtaljevanju smo namesto pufru uporabili vodo iz pipe. Preizkus na sterilnost je bil pozitiven, sistem je zaznal razrast MO. To pomeni, da sam postopek homogenizacije MO ne uniči.

Skupaj smo pridobili tri popkovnice, izvedli vse postopke ter pripravljene homogenate preizkusili na sterilnost. Izvidi (tudi pozitivna kontrola) so bili ustrezni.



Slika 1: Rezanje tkiva popkovnice.



Slika 2: Homogenizator gentleMACS



Slika 3: M Tubes



Slika 4: Stekleničke z gojiščem Bactec

Razvoj funkcijskega testa za trorodno diferenciacijo mezenhimskih stromalnih matičnih celic (MSC)

SODELUJOČI: DR. KATRINA HARTMAN, SARA PLASKAN

Po uspešni izolaciji mezenhimskih stromalnih matičnih celic (MSC) iz različnih tkiv je ključnega pomena opredeliti tako njihov fenotipski kot diferenciacijski potencial. Za to, da lahko izolirane celice uvrstimo med MSC, je Mednarodno društvo za celično in gensko terapijo (angl. ISCT – International Society for Cell and Gene Therapy) leta 2006 določilo kriterije, ki jih morajo le-te izpolnjevati: 1.) MSC morajo izkazovati sposobnost pritrditve na plastično gojitveno površino pri standardnih pogojih gojenja; 2.) Vsaj 95% MSC mora izražati označevalce pripadnosti CD105, CD90 in CD73. Ne smejo izražati krvotvornih ali endotelijskih označevalcev (<2%) CD45, CD34, CD14 ali CD11b, CD79a ali CD19 ter molekul HLA razreda II; 3.) Sposobne morajo biti diferenciacije in vitro v adipocite, osteoblaste in hondroblaste.

Na Zavodu RS za transfuzijsko medicino, Oddelku za terapevtske storitve (OTS) predstavljajo zdravila za napredno zdravljenje (ZNZ) na osnovi MSC izoliranih iz popkovnice pomemben del dejavnosti. Ključni del kontrole kakovosti ZNZ na osnovi MSC je ocena sposobnosti trorodne diferenciacije MSC, ki predstavlja nadgradnjo ocene kakovosti in varnosti celičnega pripravka zlasti v kontekstu regenerativne medicine.

Za začetek večstopenjskega procesa diferenciacije je najprej potrebno doseči ustrezno konfluentnost MSC v kulturi in vitro, zato smo v prvem delu internega projekta optimizirali število nasajenih celic in čas inkubacije. Za preverjanje trorodne diferenciacijske sposobnosti MSC smo uporabili zamrznjene ali sveže MSC izolirane iz popkovnice (PKV-MSC) ali mešanico treh neodvisnih PKV-MSC (EQ-MSC). Za adipogeno diferenciacijo smo na gojilno ploščo s 24 vdolbinicami nasadili 0,5 ml celične suspenzije MSC s koncentracijo 8×10^4 MSC/ml v gojišču za celične kulture α MED + 10% serum AB. Ko so celice dosegle 80-90% konfluenco smo zamenjali celično gojišče z gojiščem za diferenciacijo MSC v adipocite (StemMACS AdipoDiff). Celice smo nato gojili 14 dni v celičnem inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂ in jim dvakrat tedensko menjali gojišče. Pri osteogeni diferenciaciji smo na gojilno ploščo s 24 vdolbinicami nasadili 0,5 ml celične suspenzije MSC s koncentracijo 6×10^4 MSC/ml v gojišču za celične kulture α MED + 10% serum AB. Ko so celice dosegle 70-80% konfluenco smo zamenjali celično gojišče z gojiščem za diferenciacijo MSC v osteoblaste (StemMACS OsteoDiff). Celice smo gojili 10 dni v

celičnem inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂ in jim dvakrat tedensko menjali gojišče. Za hondrogeno diferenciacijo smo na gojilno ploščo s 96 vdolbinicami nasadili $2,5 \times 10^5$ celične suspenzije MSC v 0,2 ml gojišča za diferenciacijo MSC v hondroblaste (StemMACS HondroDiff). Gojilno ploščo smo centrifugirali 800 × g 8 min in nato celice gojili 24 dni v inkubatorju pri 37 °C in 5 % CO₂. Celično gojišče smo menjali dvakrat tedensko. Kontrolno skupino so predstavljali MSC gojeni v mediju αMEM + 10% serum AB. Ustreznost diferenciacije smo dokazovali z diferencialnim barvanjem komponent značilnih za določen tip tkiva: 1) maščobne kapljice obarvane rdeče z barvilom oil o rdeče pri diferenciaciji MSC v adipocite; 2) kalcijeve depozite obarvane rdeče z barvilom alizarin rdeče pri diferenciaciji MSC v osteoblaste in 3) celične skupke obarvane modro z barvilom alzian modro pri diferenciaciji MSC v hondroblaste. Po končanem barvanju je sledila analiza vzorcev z uporabo invertnega svetlobnega mikroskopa.

Z opisanim postopkom smo dobili ustrezne in ponovljive rezultate diferenciacije MSC vseh izbranih serij v adipocite, osteoblaste in hondroblaste. Hkrati smo pokazali, da so MSC v vseh kontrolnih skupinah ostali nediferencirani. Vpeljava protokola za kontinuirano preverjanje multipotentnosti pripravkov na osnovi MSC bo imela številne dolgoročne koristi, saj nam bo podala dodatno informacijo o kakovosti pripravkov in nam omogočila razvojne priložnosti za bodoče optimizacije tovrstnih zdravil. Projekt ne podpira le klinične translacije MSC ampak omogoča tudi lažjo dostopnost tovrstnih zdravil do novih indikacij.

Ex vivo priprava MSC in njihova uporaba v klinični raziskavi zdravljenja osteoartritisa kolena

SODELUJOČI: DR. KATRINA HARTMAN, PROF. DR. URBAN ŠVAJGER

Na Oddelku za terapevtske storitve (OTS) smo v sodelovanju z Ortopedsko kliniko UKC Ljubljana izvedli klinični raziskovalni projekt, v katerem smo želeli podrobno raziskati molekularne mehanizme delovanja alogenskih mezenhimskih stromalnih matičnih celic (MSC) pri bolnikih s terminalnim osteoartritisom kolena (KOA). Čeprav je uporaba MSC v ortopedski regenerativni medicini že razširjena, so natančni mehanizmi njihovega terapevtskega učinka še vedno slabo poznani. Prav razjasnitev teh mehanizmov je bila osrednje vodilo naše raziskave.

Projekt temelji na uporabi MSC, izoliranih iz popkovničnega tkiva, ki smo jih proizvedli v čistih prostorih OTS po validiranih postopkih. Po začetni ekspanziji v prvih dveh prehodih (P0 in P1) so bile celice krioprezervirane in nato pred uporabo dodatno kultivirane (P2), da smo zagotovili njihovo optimalno funkcionalno stanje. Končni celični produkt je vseboval 20 milijonov MSC, pripravljenih v 4 ml suspenzije za intraartikularno aplikacijo.

V akademsko klinično raziskavo (NCT06078059) smo vključili 15 bolnikov s KOA 4. stopnje po Kellgren-Lawrence klasifikaciji, ki so bili kandidati za elektivno totalno artroplastiko. Zasnova raziskave je bila osredotočena na primerjavo pred- in poaplikacijskih biomarkerjev (izhodiščni in po terapiji), ki omogočajo vpogled v biološke učinke MSC na sklepno okolje.

Z namenom razumevanja zgodnjih učinkov MSC smo analizirali spremembe biomarkerjev v sinovialni tekočini ter izražanje genov v sinoviji in hrustancu, zbranih med operacijo. Uporabili smo širok nabor označevalcev, povezanih z metabolizmom hrustanca (npr. PIIANP, aggrecan, COMP), vnetjem (IL-1 β , IL-6, TNF- α), bolečino (NGF), imunomodulacijo (CD14, CD163, CCL2) in signalnimi potmi kostnega metabolizma (BMP-2, sclerostin, DKK-1). Izražanje genov smo analizirali z metodo qRT-PCR, beljakovinske označevalce pa z ELISA in Luminex tehnologijo.

Poleg tega smo spremljali klinični odziv bolnikov z uporabo validiranih vprašalnikov KOOS, VAS in EQ-5D-3L. Čeprav klinični parametri niso bili primarni cilj, nam omogočajo pomembno korelacijo med zaznanimi učinki in spremembami na molekularni ravni.

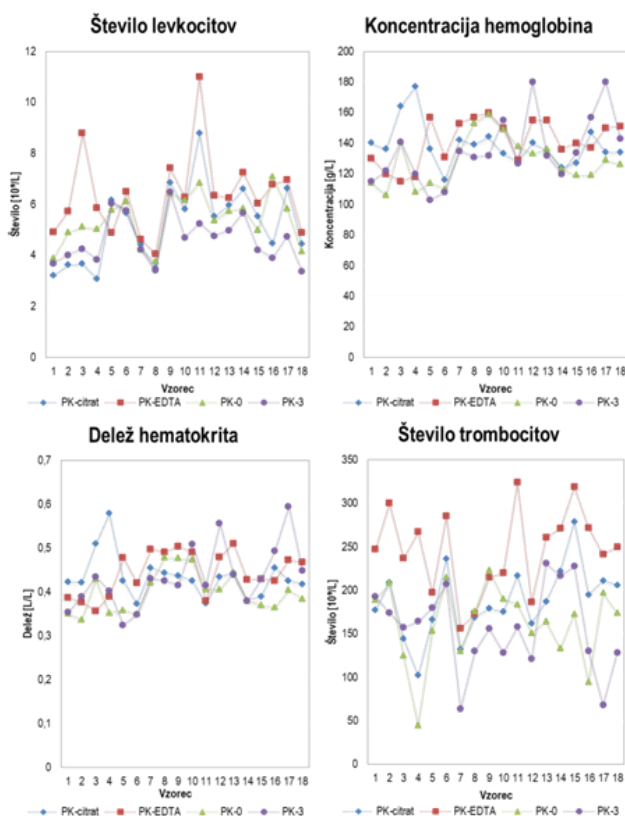
Ta študija je ena redkih, ki poskuša sistematično pojasniti, kako MSC delujejo v

sklepu neposredno po aplikaciji, zlasti v smislu vpliva na imunske poti, vnetne mediatorje in presnovo hrustanca. Rezultati bodo prispevali k boljšemu razumevanju terapevtskih potencialov MSC ter predstavljajo osnovo za nadaljnji razvoj celičnih terapij za KOA.

Uvedba laboratorijskih postopkov za določanje zunajceličnih veziklov v krvnih komponentah krvodajalcev

SODELUJOČI: ANA KOLENC, BOŠTJAN SMREKAR, DR. MAJA GRUNDNER, NIKA POŽUN, URŠKA DOLINAR, SILVA PLEŠKO, PROF. DR. PRIMOŽ ROŽMAN

Darovano kri v transfuzijskih centrih obdelujemo in ločujemo na posamezne krvne komponente, kot so eritrociti, trombociti in plazma. Kakovost komponent med shranjevanjem natančno spremljamo s predpisanimi postopki, ki vključujejo analizo virusnih označevalcev, določanje koncentracije rezidualnih levkocitov, stopnje hemolize ter druge hematološke in biokemijske parametre. V sodobni transfuzijski medicini se med naprednimi pristopi za oceno kakovosti krvnih komponent omenja tudi analiza zunajceličnih veziklov (ZV). Prisotnost ZV v krvnih komponentah je lahko povezana z različnimi biološkimi učinki, med katerimi so najpogostejše opisani indukcija vnetnega odziva, aktivacija hemostatskih mehanizmov in modulacija imunskega sistema. Povišane koncentracije ZV, ki se lahko pojavijo med shranjevanjem krvnih pripravkov, so tako potencialno povezane z večjim tveganjem za neželene transfuzijske učinke pri prejemnikih.

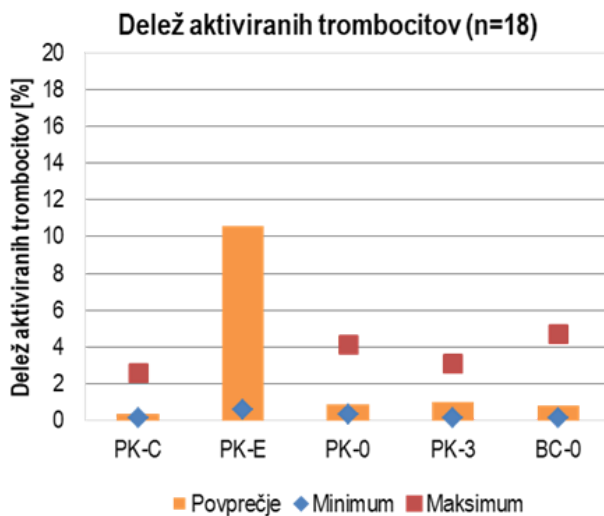


Spremljanje parametrov kakovosti, ki jih bomo primerjali z zunajceličnimi vezikli:

V okviru internega projekta smo leta 2024 zbrali vzorce polne krvi in pripadajočih krvnih komponent 18 krvodajalcev. Za namen raziskave smo pridobili soglasje Komisije za medicinsko etiko (številka 0120-183/2024-2711-3). Vzorčenje polne krvi in krvnih komponent je bilo opravljeno na dan odvzema ter 1., 7., 21., 30. in 42. dan po odvzemu krvi, odvisno od vrste komponente in pogojev shranjevanja.

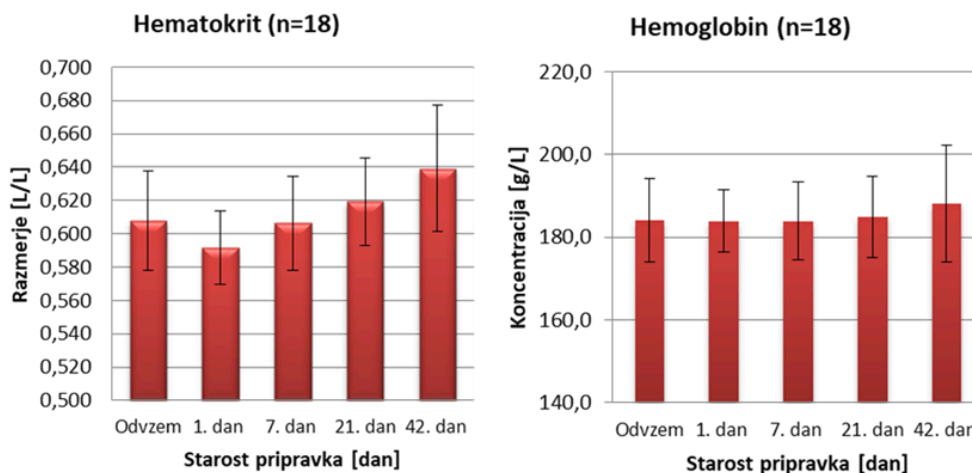
Slika 5: Primerjava vrednosti parametrov polne krvi (PK) na dan odvzema v epruvete z različnimi antikoagulanti (EDTA, CPD; 18 krvodajalcev). PK-0: polna kri ob odvzemu v CPD; PK-3: polna kri 3 ure po odvzemu v CPD.

Analizirali smo tudi delež aktiviranih trombocitov v vzorcih polne krvi, pri čemer je bila kri odvzeta v različne antikoagulate (citrati, EDTA, CPD), ter v levkocitno-trombocitni plasti (buffy coat-u).



Slika 6: Aktiviranost trombocitov v vzorcih polne krvi 18 krvodajalcev (citratna epruveta (PK-C); EDTA epruveta (PK-E); iz vrečke ob odvzemu (PK-0); 3h po odvzemu (PK-3) oz. pred centrifugiranjem in v levkocitno-trombocitni plasti (BC-0).

Določali smo tudi koncentracijo rezidualnih levkocitov in izvedli celovit hemogram, hematokrit in hemolizo na dan odvzema, 1. dan, 7. dan, 21. dan in 42. dan. hematokrit ter hemoliza na koncu hranjenja (42. dan).



Slika 7: Analize parametrov kakovosti eritrocitnih komponent.

Zbiranje in priprava vzorcev za analize zunajceličnih veziklov:

Za analize ZV smo plazemske vzorce obdelali z večkratnim postopkom centrifugiranja, s čimer smo odstranili celične ostanke in večje delce. Tako pripravljene vzorce smo shranili pri temperaturah -20°C in -80°C , da bi zagotovili njihovo stabilnost do nadaljnje obdelave. Shranili smo več kot 200 vzorcev za nadaljnje raziskave zunajceličnih veziklov. Analize bodo vključevale uporabo naprednega analizatorja za sledenje nanodelcev (NTA – nanoparticle tracking analysis) ali ekvivalentne metode ter slikovnega pretočnega citometra, kar bo omogočilo določanje koncentracije, velikosti in fenotipskih značilnosti veziklov.

Pilotna študija zdravljenja kserostomije z alogenskimi mezenhimskimi stromalnimi matičnimi celicami

SODELUJOČI: DR. KATRINA HARTMAN, KAJA ZAJC, DR. NATAŠA TEŠIĆ

Kserostomija je ena najpogostejših dolgoročnih posledic obsevanja glave in vratu pri bolnikih z rakom orofaringealne regije. Zaradi uničenja žlez slinavk ob obsevanju imajo ti bolniki pogosto zmanjšan pretok sline, težave pri govoru, požiranju, okužbah in pomembno znižano kakovost življenja. Kljub številnim paliativnim ukrepom ni na voljo vzročnega zdravljenja, kar upravičuje iskanje regenerativnih rešitev.

Na Zavodu RS za transfuzijsko medicino, Oddelku za terapevtske storitve v sodelovanju z Onkološkim inštitutom Ljubljana in drugimi partnerji izvajamo prvo slovensko akademsko klinično raziskavo zdravljenja kserostomije z alogenskimi MSC, izoliranimi iz človeške popkovnice. Osrednji namen študije je raziskati varnost in preliminarno učinkovitost terapije, hkrati pa tudi podrobneje preučiti biološke in funkcionalne mehanizme delovanja MSC na poškodovane žleze slinavke.

Projekt se smiselno in neposredno naslanja na rezultate dveh preteklih raziskovalnih projektov: »Optimizacija protokola za pridobitev mezenhimskih matičnih celic za klinično rabo«, v okviru katerega smo razvili robusten, validiran sistem izolacije, ekspanzije in formulacije MSC iz popkovničnega tkiva, ter »Razvoj in uvedba testa sterilnosti za tkivo popkovnice«, s katerim smo zagotovili varen in sledljiv vhodni material za proizvodnjo celičnih zdravil.

S tem smo vzpostavili stabilno in ponovljivo proizvodnjo kakovostnih MSC, ki služi kot osnova za vse nadaljnje klinične aplikacije. Sedanja študija je tako logična nadgradnja in klinična translacija teh razvojnih aktivnosti, kar izkazuje povezanost in konsistentnost raziskovalnega dela.

V klinično raziskavo (NCT06012604) je predvideno vključiti 10 bolnikov, ki izpolnjujejo stroga merila (≥ 2 leti po zaključenem (kemo)obsevanju, brez znakov ponovitve bolezni, potrjena kserostomija stopnje 2 ali 3). Do zdaj smo uspešno tretirali 8 bolnikov, pri čemer nismo zaznali nobenih resnih neželenih učinkov, nekaj bolnikov pa je poročalo o prehodni bolečini na mestu injiciranja.

Vsak bolnik prejme skupno 150 milijonov MSC: 50 milijonov v vsako parotidno in 25 milijonov v vsako submandibularno žlezo, z ultrazvočno vodeno aplikacijo brez

anestezije. MSC so pripravljene sveže (P2), v standardizirani formulaciji z visoko celično sposobnostjo in vitalnostjo.

Učinke spremljamo s kombinacijo kliničnih, funkcionalnih in molekularnih kazalcev: merimo pretok in sestavo sline, izvajamo MRI, ultrazvočno elastografijo, scintigrafijo, analiziramo biopsije žlez in uporabljamo validirane subjektivne vprašalnike (VAS, Xerostomia, QLQ-H&N35). Preliminarni rezultati so spodbudni – nekateri bolniki poročajo o izboljšani kakovosti sline in občutku večje vlažnosti ustne votline.

Zaključna analiza bo izvedena po vključitvi vseh 10 bolnikov (predvidoma v začetku naslednjega leta). Projekt ne potrjuje le varnosti in izvedljivosti MSC terapije, temveč temelji na predhodno vzpostavljenih tehnoloških in varnostnih standardih za celične terapije.

Spektrofotometrično določanje celokupnega prostega hemoglobina v plazmi na aparatu BioTek Epoch – uvedba nove metode

SODELUJOČI: MAG. MAJA ČERNILEC, SILVA PLEŠKO, DR. VALERIJA KOVAČ, IRMA HOSTNIK

Uvod: Zavod za transfuzijsko medicino (ZTM) si prizadeva za neodvisnost pri določenih laboratorijskih analizah, ki so ključne za zagotavljanje kakovosti in varnosti krvnih komponent. Ena takih analiz je določanje celokupnega prostega hemoglobina v plazmi, ki služi kot kazalnik stopnje hemolize in je pomemben parameter pri oceni ustreznosti krvnih pripravkov. Do nedavnega smo to preiskavo naročali pri zunanjem izvajalcu (KIKKB, UKC), kar je predstavljalo tako časovno kot finančno obremenitev. Zato smo se odločili za interni projekt uvedbe lastne metode določanja prostega hemoglobina na ZTM.

Potek dela: Sprva smo načrtovali, da bi metodo implementirali na že obstoječem spektrofotometru BioTek Epoch, vendar bi ta predstavljala t. i. in-house metodo, za katero evropska uredba IVDR 2017/746 in predlog nacionalnega Zakona o zagotavljanju kakovosti v zdravstvu (ZZKZ) predvidevata strogo regulacijo, validacijo in visoke stroške certificiranja. Zaradi teh omejitev smo se odločili za alternativo – uvedbo metode na IVD-odobrenem POCT analizatorju HemoCue Plasma/Low Hb, ki je že uveljavljen v več evropskih transfuzijskih centrih.

Po pridobitvi analizatorja smo izvedli verifikacijo metode, pri kateri smo primerjali rezultate HemoCue z obstoječo metodo, ki jo uporablja KIKKB. Uporabili smo Passing-Bablok regresijsko analizo, saj ta upošteva napake v obeh metodah in ne predpostavlja normalne porazdelitve podatkov. Rezultati so pokazali, da med metodama obstaja visoka korelacija (Spearman $r = 0,972$), vendar HemoCue sistematično meri nekoliko višje vrednosti pri višjih koncentracijah in 0,18 enote nižje pri zelo nizkih koncentracijah glede na primerjavo s spektrofotometrom, ki ga uporablja KIKKB.

Kljub tem razlikam metoda HemoCue v kliničnem smislu ne predstavlja tveganja – nižja vrednost od mejne zagotovo pomeni ustrezen pripravek, višja pa pomeni konzervativno odločitev (možna zavrnitev sicer ustreznega vzorca). Tako metoda ne more voditi v napačno uporabo neustrezne krvne komponente, kar je z vidika varnosti bolnika ključno.

Zaključek: Z uvedbo metode določanja prostega hemoglobina na analizatorju

HemoCue Plasma/Low Hb smo dosegli cilj internega projekta: zmanjšali smo odvisnost od zunanjih izvajalcev, omogočili hitrejšo dostopnost rezultatov, predvsem v nujnih primerih, in okrepili kakovostno kontrolo v okviru ZTM. Čeprav metoda ni povsem primerljiva z dosedanjo, omogoča zanesljivo in varno presojo ustreznosti krvnih komponent za izdajo in uporabo. Projekt predstavlja primer uspešne prilagoditve zakonodajnim zahtevam in racionalne izbire v okviru sodobne laboratorijske diagnostike. Z novo metodo že sodelujemo z zunanjo shemo kontrole kakovosti Instand in smo že v prvem krogu sodelovanja prejeli certifikat ustreznosti rezultatov.



Slika 8: HemoCue® Plasma/Low Hb System

Optimizacija afereznih postopkov na Centru za afereze OTS

SODELUJOČI: MAG. MARKO CUKJATI, KATJA PETRUŠA

Presaditev krvotvornih matičnih celic (KMC) je uveljavljen del terapevtskih protokolov za zdravljenje določenih bolezni. Število zbranih CD34+ celic je odvisno od koncentracije CD34+ v periferni krvi ter od uspešnosti postopka afereze. Zadostno število CD34+ v krvi je odvisno od mnogih dejavnikov in sicer: starosti, protokola mobilizacije, stadija bolezni ter predhodnega zdravljenja. Uspešnost postopka vrednotimo na podlagi učinkovitosti zbiranja (CE), oziroma deleža KMC, ki jih zberemo tekom prehoda polne krvi skozi centrifugo celičnega ločevalca. Čim večja je učinkovitost zbiranja, več celic bomo zbrali pod istimi začetnimi pogoji. CE je eden ključnih dejavnikov na podlagi katerega lahko predvidevamo število zbranih CD34+ celic.

Obstajata dve formuli za izračun učinkovitosti in sicer formula CE2, ki predvideva da se število celic CD34+ določeno pred postopkom ne spreminja, ter formula CE1, ki upošteva tudi število CD34+ celic po postopku in bolj odraža dejansko učinkovitost zbiranja. Ker se na centru za afereze rutinsko določa samo CE2 smo v sklopu internega projekta "Optimizacija afereznih postopkov na centru za afereze oddelka za terapevtske storitve" določali še število CD34+ po odvzemu, ki nam je omogočalo izračun CE1.

Tabela 1: Demografski podatki, število CD34+ celic ter vrednosti CE1 oz. CE2.

Parameter	n (%), mediana (razpon)
Število bolnikov/odvzemov	26/50
Spol moški/ženski	20 (79,93%)/6 (20,07%)
Telesna teža	77 (52-115)
CD34+/μL pred odvzemom	27,28 (9,1-85,55)
CD34+/μL po odvzemu	20,82 (4,2-57,12)
CD34+ CE2%	53,01 (13,16-128,41)
CD34+ CE1%	68,25 (13,34-115,45)

V letu 2024 je v sklopu projekta bilo obravnavanih skupno 26 bolnikov, pri katerih je bilo izvedenih 50 postopkov afereze. *Tabela 1.* prikazuje demografske podatke, število CD34+ celic pred in po odvzemu ter vrednosti CE1 oz. CE2.

Največ bolnikov je bilo napoteni s Kliničnega oddelka za hematologijo UKC in sicer 20 odvzemov kar je 77% vseh obravnavanih bolnikov. Z Onkološkega inštituta so bili napoteni trije bolniki (11%). Naredili smo tudi en odvzem za SD (4%) ter dva odvzema pri alogenskih sorodnih darovalcih (8%).

Največ bolnikov je bilo z dg. Multiplega mijelom in sicer 20 (80%), potem sledita dva bolnika z Limfom plaščnih celic (8%), ter po eden bolnik z Folikularnim limfomom, Germinalnim tumorjem testisa ter Difuznim velikoceličnim B-limfomom.

Na podlagi analiziranih parametrov ugotavljamo, da so se vrednosti CD34+ po odvzemu večinoma znižale ter da je zaradi tega posledično CE1 večja kot CE2. V cilju optimizacije aferznih postopkov je zelo pomembno, da se čim bolj približamo dejanski vrednosti CE, kar je bistveno pri planiranju aferznih odvzemov ter določanju volumna, ki ga je potrebno predelati v cilju pridobivanja zelenega števila celic. Po drugi strani pa lahko bolj zanesljivo definiramo vpliv določenih dejavnikov na učinkovitost in sicer: starosti, spola, teže bolnikov, tipa odvzema, načina stimulacije (GCSF, GCSF+KT, GCSF+ Plerixafor). Z poglobljeno analizo podatkov, ki smo jih pridobili v sklopu internega projekta lahko izboljšamo kakovost, optimiziramo delo na oddelku ter zvišamo varnost bolnikov.

Nacionalni in medregionalni raziskovalni projekti ter raziskovalni program

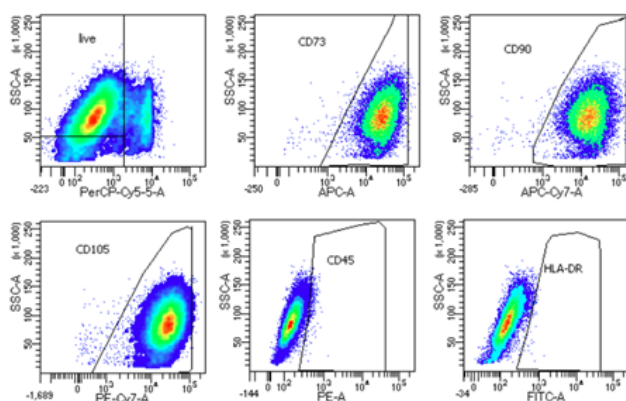
1. Učinkovitost mezenhimskih matičnih celic in zunajceličnih veziklov za obnovo roženičnega tkiva
2. Razvoj novih nizkomolekularnih modulatorjev Tollu podobnih receptorjev 7
3. Inducibilno programiranje intrinzičnih lastnosti celic CAR T za imunoterapijo raka
4. Inovativna imunoterapija raka preko CAR T celic (CARRS)
5. IMMUNOCLUSTER-2 Uvedba klinične študije z naprednim celičnim zdravilom aHyC na medregionalni ravni
6. Sintezna biologija in imunologija (JARD RS)

Učinkovitost mezenhimskih matičnih celic in zunajceličnih veziklov za obnovo roženičnega tkiva (ARIS projekt št. J3-50107)

IZR. PROF. DR. ELVIRA MALIČEV, ANA KOLENC,
DR. ZALA MARZIDOVŠEK

Roženica je prosojen sprednji del očesa, ki ima ključno vlogo pri prenosu svetlobe do mrežnice. Po poškodbi, okužbi ali vnetju se lahko zaceli z brazgotino, kar vodi v izgubo prosojnosti. Za zdravljenje se preizkušajo različne možnosti, med njimi tudi uporaba mezenhimskih matičnih celic (MMC) za diferenciacijo v roženične celice, kot so epitelne celice, keratocitom podobne celice in endotelne celice podobne celice. Poleg tega MMC proizvajajo rastne dejavnike, ki pospešujejo celjenje roženičnega epitela, npr. HGF, FGF-2 in IGF-1. Študije so pokazale, da MMC zmanjšajo vnetni odziv v tkivu roženice z znižanjem izločanja pro-vnetnih citokinov IL-1, IL-2 in TNF- α . Ker MMC posredujejo bioaktivne molekule predvsem preko zunajceličnih veziklov (ZV), bi uporaba ZV lahko omogočila brezcelično zdravljenje. Prve klinične študije z ZV za obnovo očesne površine in roženične strome pokazale obetavne kratkoročne rezultate, obstaja pa še veliko neznank v razumevanju delovanja ZV, metodah njihovega pridobivanja in analize ter shranjevanja ZV.

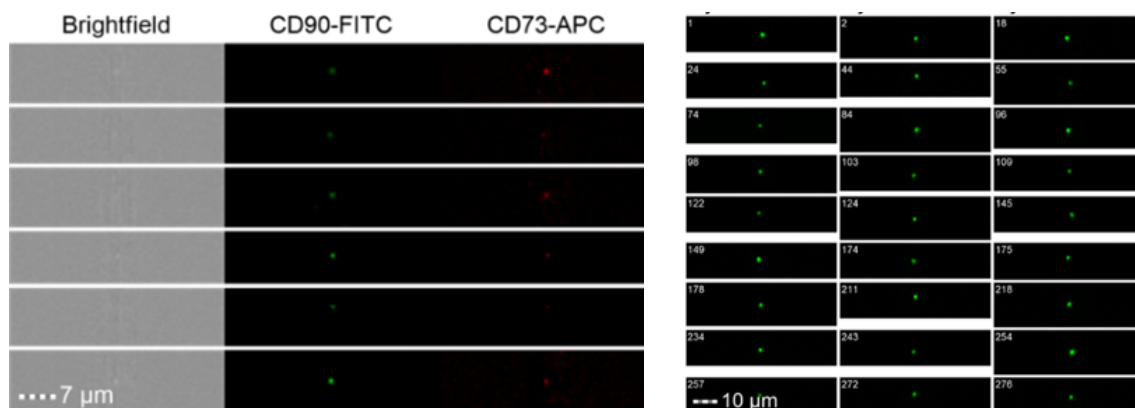
V prvi fazi raziskave smo pripravili celične kulture iz MMC pridobljenih iz različnih tkiv (kostnega mozga, maščobnega tkiva in popkovine). Po preverjanju celičnega fenotipa (CD73, CD90, CD105, CD45, HLA-DR) in diferenciacijskih sposobnosti v osteoblaste, hondroците in adipocyte, smo iz celičnih kultur na različne načine izolirali ZV in jih koncentrirali z enkratnim ali večkratnim ultracentrifugiranjem.



Slika 9: Mezenhimske matične celice - fenotipizacija pretočna citometrija

Nato smo z metodo sledenja nanodelcev (NTA) in slikovnim pretočnim citometrom zbrali podatke o koncentraciji in velikosti ZV. Metodo za analizo ZV s slikovnim pretočnim citometrom smo postavili v Laboratoriju za pretočno citometrijo, za kar smo porabili precej časa. ZV so namreč bistveno manjši od celic in izražajo nizko število površinskih biomarkerjev, kar vodi do šibkih signalov, občutljivih na

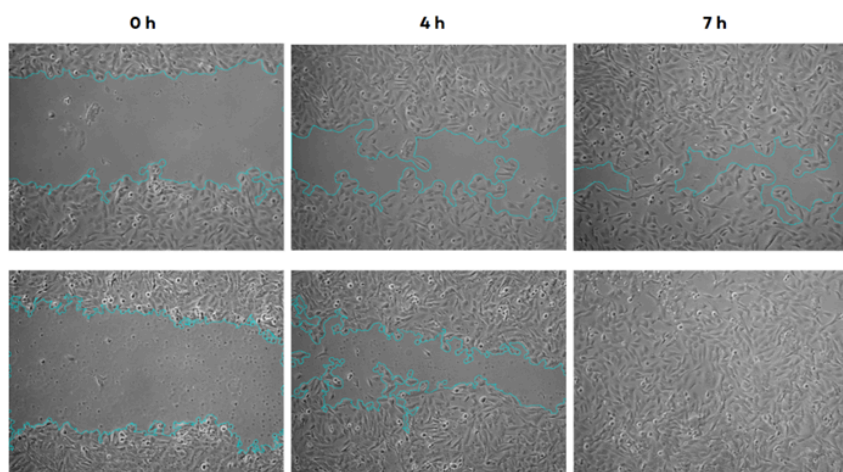
nespecifično ozadje. Zaradi omejenega števila vezavnih mest na ZV je dodatno pomembno prilagoditi koncentracijo protiteles in izbrati primerna fluorescenčna barvila za zagotovitev optimalne detekcije površinskih označevalcev. Ker nevezanih protiteles pred analizo ni mogoče odstraniti, lahko nespecifična vezava in agregati protiteles posnemajo signale ZV. Zato je natančna optimizacija priprave vzorcev in uporaba ustreznih eksperimentalnih kontrol ključna za detekcijo ZV in zanesljivo razlikovanje pravih signalov od artefaktov.



Slika 10: Zunanji celični vezikli – fenotipizacija in koncentracija (slikovna pretočna citometrija)

Po analizah vzorcev smo ugotovili, da največji donos veziklov dosežemo z gojenjem celic v višjih pasajah, daljšo izpostavitvijo gojišču brez seruma ter ob izolaciji z enojnim ultracentrifugiranjem. Povprečna velikost ZV je bila 143 nm.

Pripravili smo tudi celično kulturo roženičnih epitelijskih celic in optimizirali test za opredelitev terapevtskega potenciala na ex vivo modelu poškodbe epitelijske roženice. S testom ocenjujemo vpliv MMC ali vpliv njihovih ZV na epitelijske celice.



Slika 11: Roženične epitelijske celice – vpliv ZV na proliferacijo celic na modelu poškodbe epitelijske roženice

V nadaljevanju projekta bomo za raziskovanje vpliva MSC uporabili transwell sisteme. Izvedli bomo test, s katerim bomo preverili potencialni protivnetni učinek MSC in njihovih ZV na zmanjšanje vneja roženičnega epitelijskega tkiva. Poleg tega bomo analizirali tudi mehanizem privzema terapevtskih ZV v epitelijske celice roženice.

Razvoj novih nizkomolekularnih modulatorjev Tollu podobnih receptorjev 7 (ARIS projekt št. J1-4417)

PROF. DR. URBAN ŠVAJGER

Tollu podobni receptorji (TLR) so pomembni senzori prirojenega imunskega sistema, katerih aktivacija sproži signalne poti, ključne za vnetni odziv in povezovanje s pridobljeno imunostjo. Med njimi je TLR7 še posebej zanimiv zaradi svoje zmožnosti zaznavanja virusne RNA in aktivacije dendritičnih celic (DC) – centralnih posrednikov med prirojenim in prilagojenim imunskim odzivom. S tem postaja TLR7 izjemno privlačna tarča za razvoj novih adjuvansov v protitumorskih cepivih in kombinacijskih imunoterapij v onkologiji.

Cilj našega projekta je bil razvoj novega kemijskega razreda selektivnih TLR7 agonistov z izboljšano varnostjo in učinkovitostjo, primernih za imunomodulacijo v terapevtske namene. Na osnovi predhodnih raziskav naše skupine smo oblikovali knjižnico 45 spojin z jedrom 6-(trifluorometil)izoksazolo[5,4-d]pirimidin-4-amin, ki predstavlja novo strukturo (nov kemotip) v polju TLR7 agonistov. Spojine so bile sintezno zasnovane za možnost nadaljnje funkcionalizacije in prilagajanja za uporabo kot adjuvansi.

Najmočnejši predstavnik iz knjižnice, spojina 21a, je pokazala visoko selektivno aktivnost na TLR7 ($EC_{50} = 7,8 \mu M$), ni bila citotoksična ter je v eksperimentih na človeških PBMC povzročila izločanje ključnih imunskih citokinov (IL-1 β , IL-12p70, TNF- α , IL-8). Tak profil imunostimulacije je posebej pomemben za aktivacijo dendritičnih celic v protitumorskih vakcinah, saj omogoča zorenje DC in njihovo zmožnost za učinkovito predstavitev tumorskih antigenov celicam T.

Strukturno optimizacijo smo dosegli z zamenjavo tradicionalnega kinazolinskega obročja z izoksazolo[5,4-d]pirimidinom, kar je omogočilo nove interakcije v aktivnem mestu TLR7, kot je potrdila računalniška analiza vezave spojine 21a. Dodatne strukture so omogočile raziskovanje vpliva različnih substituentov na agonistično aktivnost in selektivnost.

Projekt predstavlja pomemben prispevek k razvoju nizkomolekularnih adjuvansov nove generacije, ki so ciljno usmerjeni, varni in biološko učinkoviti. Spojina 21a je obetaven kandidat za nadaljnji razvoj kot adjuvans v celičnih cepivih proti raku, zlasti v kontekstu kombiniranih pristopov z inhibitorji imunskih kontrolnih točk (checkpoint inhibitors) ali T-celičnih terapij. Rezultati omogočajo tudi širšo translacijo v cepivne platforme za infekcijske bolezni, zlasti kjer je potrebna močna aktivacija Th1 imunskega odziva.

Z raziskavo smo pokazali, kako lahko razvoj novih imunomodulatorjev v povezavi z imunološko karakterizacijo vodi do razvojno relevantnih spojin, ki odpirajo nova vrata za klinične aplikacije na področju onkološke imunoterapije.

Inducibilno programiranje intrinzičnih lastnosti celic CAR T za imunoterapijo raka (ARIS projekt št. J3-3084)

DR. VALERIJA KOVAČ, PROF. DR. VLADKA ČURIN
ŠERBEC

Projekt Javne agencije za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS) J3-3084 Inducibilno programiranje intrinzičnih lastnosti celic CAR T za imunoterapijo raka, ki je bil financiran v okviru programa Aleša Debeljaka, je potekal med 1.10.2021 in 31.12.2024 pod vodstvom doc. dr. Anžeta Smole (Nacionalni inštitut za biologijo). V projektu so sodelovali raziskovalci iz Nacionalnega inštituta za biologijo, Onkološkega inštituta Ljubljana, Univerze v Ljubljani (Biotehniška fakulteta) in Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino. Projekt se je osredotočal na postavljanje temeljev za razvoj inovativnih imunoterapij CAR T (angl. »Chimeric Antigen Receptor T cells«) naslednje generacije, ki bi lahko izboljšale zdravljenje raka ter prenos znanja in izkušenj, ki jih je vodja projekta pridobil v tujini, v Slovenijo.

CAR T celična imunoterapija je prvi klinično odobren pristop zdravljenja nekaterih krvnih rakov z uporabo gensko spremenjenih celic T. Kljub temu, da imunoterapija raka s celicami CAR T predstavlja spremembo zdravljenja raka, se srečuje s številnimi izzivi. Primer izziva je učinkovitost delovanja celične imunoterapije pri trdnih tumorjih, ki predstavljajo večino rakastih obolenj. Drugi izziv predstavlja zmanjšanje škodljivih stranskih učinkov imunoterapije, kot je citokinska nevihta, kjer gre za buren imunski odziv, ki lahko privede do življenjsko ogrožajočih zapletov.

Reševanje izzivov je bilo osredotočeno na:

- Nadgradnjo celic CAR T za ciljanje CD19 tumorjev z inducibilnim izražanjem transkripcijskega faktorja.
- Preučiti kako inducibilno izražanje transkripcijskega faktorja izboljšajo terapevtsko pomembne funkcije človeških CAR T celic v poskusih in vitro.
- Ovrednotiti celice i/cTF-CAR T in vivo z uporabo predkliničnih mišjih modelov.

Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino je pri projektu sodeloval pri zagotavljanju primarnih človeških celic T, potrebnih za generiranje celic CAR T in postavitev metod, ter z deljenjem svojih znanj na področju raziskave ter kakovosti dela v laboratoriju.

Inovativna imunoterapija raka preko CAR T celic (CARRS) (ARIS projekt št. J7-4640)

DR. VALERIJA KOVAČ, PETRA KERN, PROF. DR. VLADKA ČURIN ŠERBEC

Projekt Javne agencije za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije (ARIS) J7-4640 Inovativna imunoterapija raka preko CAR T celic (CARRS), ki je bil na razpisu izbran kot veliki projekt, poteka med 1.10.2022 in 30.9.2025 pod vodstvom prof. dr. Romana Jerale (Kemijski inštitut). V projektu sodelujejo raziskovalci iz Kemijskega inštituta, Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana, Univerze v Ljubljani (Medicinska fakulteta) in Zavoda Republike Slovenije za transfuzijsko medicino.

Imunoterapija raka, ki temelji na avtolognih T celicah, zasnovanih za proizvodnjo himernih antigenskih receptorjev (CAR), je pokazala odlično učinkovitost za omejeno vrsto hematoloških rakov. CAR T celična terapija predstavlja eno od uspešnih zgodb sintetične biologije z odličnim kliničnim translacijskim potencialom, saj je mogoče prilagoditi celično odzivnost in uvesti nove vrste regulacije. Projekt se osredotoča na zasnovi in testiranju več inovativnih strategij sinteze biologije, povečanje varnosti in učinkovitosti, ter razširiti novo razvite terapije na dodatne vrste raka.

Cilji projekta so :

- a) oblikovanje CAR, ki bodo manj občutljivi na pobeg antigena,
- b) spreminjanje CAR signalne poti z inženiringom transmembranskih domen,
- c) uvedba alternativnih signalnih domen za omejevanje izčrpanosti T celic,
- d) uvedba popolnoma humaniziranih regulatorjev aktivnosti T celic, da se prepreči prekomerna aktivacija, ki lahko povzroči škodljive učinke ali zagotovi počitek T celicam,
- e) združitev signaliziranja CAR poti s signalnimi potmi prirojene imunosti,
- f) testiranje konceptov v celičnih linijah, primarnih T celicah in na živalskih modelih in
- g) priprava regulatornega okvira kliničnega preskušanja za najbolj uspešne dizajne.

Raziskovalna skupina Biomedicina (0311-004) pri projektu sodeluje pri oblikovanju originalnih CAR. Že dosežene rezultate smo v letu 2024 predstavili na dveh mednarodnih konferencah doma in v tujini.

Vir: SICRIS

IMMUNOCLUSTER-2: Uvedba klinične študije z naprednim celičnim zdravilom aHyC na medregionalni ravni

MAG. MARKO CUKJATI

Projekt IMMUNOCLUSTER-2 naslavlja krepitev čezmejnega sodelovanja za izboljšanje kakovosti življenja prebivalcev. Splošni cilj projekta je začetek kliničnega preskušanja za zdravljenje trojno negativnega raka dojke (TNBC) s celičnim cepivom (aHyC) na medregionalni ravni.

Osnova je inovativno celično zdravilo na osnovi imunohibridomov (aHyC), ki je bilo razvito s strani podjetja Celica za zdravljenje na kastracijo odpornega raka prostate in je že preizkušeno v klinični študiji faze I/II (rezultati so objavljeni v mednarodnih revijah). Pri proizvodnji zdravila se uporabljajo avtologne mononuklearne celice, iz katerih se izolirajo monociti in diferencirajo v dendritične celice (DC). Slednje se z elektrofuzijo zlijejo s tumorskimi celicami in nato uporabijo kot tumorske vakcine.

S strani Italijanskega partnerja VivaBioCell se bo v proizvodnjo imunohibridomov vključil bioreaktor NANT z namenom povečati proizvodnjo kapaciteto. Takšna nadgradnja sistema zahteva ponovno validacijo in optimizacijo postopkov, vključno s certificiranjem s strani JAZMP po standardu GMP.

Na slovenski strani sta v projekt zdravljenja z aHyC vključeni dve javni zdravstveni ustanovi (Zavod RS za transfuzijsko medicino (ZTM) in Onkološki inštitut Ljubljana (OIL)). Na italijanski strani sodelujeta javna bolnišnica Friuli Centrale (ASUFC) in Univerza v Vidmu (UNIUD), ki pripravljata pogoje za vključitev italijanskih bolnikov v klinično študijo.

Da bi povečali dostopnost naprednega celičnega zdravila za paciente v celotni regiji, je potrebna dobra sinhronizacija med proizvodnjo zdravila in njegovo aplikacijo, ki naj bi potekala v Sloveniji. Italijanski bolniki naj bi se vključevali v preizkusno zdravljenje v Sloveniji, doktrinarno zdravljenje pa bo v nadaljevanju potekalo na ustanovi ASUFC v Vidmu. Zaradi zahtevne in relativno nove zakonodaje na področju zdravil za napredno zdravljenje (ZZNZ), ter administrativnih nacionalnih zahtev glede upravičenosti zdravljenja in vključevanja v klinična preskušanja izven državnih meja, je priprava takšne platforme izjemno zahtevna a zelo dobrodošla.

ZTM v okviru projekta zagotavlja dobavo afereznega materiala za proizvodnjo imunohibridomov. Pri vsakem pacientu je pred postopkom opravljena klinična

ocena primernosti za aferezo. Za vse dodatne pripravljalne korake, kot so transfuzija krvnih komponent ali vstavev centralnega venskega katetra, poskrbi zdravnik, ki vodi zdravljenje. Zaradi specifične populacije bolnikov je potrebno merila za izbor darovalcev za aferezo ovrednotiti in ustrezno prilagoditi. Tehnična izvedba afereze mora biti optimizirana z namenom zagotavljanja zadostne učinkovitosti in varnosti za pacienta ter kakovosti afereznega produkta. ZTM bo zagotavljal tudi obsevanje tumorskega tkiva namenjenega pripravi imunohibridomov z rentgenskimi žarki.

V letu 2024 so bile glavne aktivnosti usmerjene v optimizacijo afereznega odvzema. Ustrezno število in kakovost monocitov v afereznem pripravku je pomembna za uspešno pripravo imunohibridomov.

Monociti vplivajo na številne dejavnike napredovanja tumorjev, in sicer na protitumorsko imunost, angiogenezo in metastaziranje. Študije kažejo, da sistemsko okolje, ki ga povzroča tumor, vpliva na razvoj in fenotip monocitov. Posledično se pri bolnikih z rakom pojavijo funkcionalne spremembe monocitov v periferni krvi, kot sta pridobitev imunosupresivne dejavnosti in zmanjšana odzivnost na vnetne dražljaje.

Med aferezo prihaja do aktivacije trombocitov in sproščanja vnetnih dejavnikov, ki lahko vplivajo na fenotip monocitov in njihovo sposobnost, da se diferencirajo v DC. Tudi interakcija med trombociti in monociti lahko vodi do nastanka provnetnega fenotipa monocitov. V objavljenih raziskavah je bilo pri pacientkah brez odziva na zdravljenje značilno nižje število celic CD14^{low}CD16⁺HLA-DR⁺, ob prisotnosti raka pa je bilo povečano izražanje CD163. Monociti, ki imajo zmanjšano ali celo odsotno izražanje HLA-DR (monociti CD14⁺HLA-DR^{lo}/neg) pa so mediatorji tumorske imunosupresije in njihova prisotnost nakazuje slabšo odzivnost na imunoterapije, saj nizke ravni HLA-DR (še posebej pod 30%) lahko zmanjšajo sposobnost aktivacije limfocitov T.

Ker vnetni dejavniki pomembno vplivajo na fenotip in funkcijo monocitov pri bolnicah z rakom dojke, lahko posledično zmanjšajo njihovo sposobnost diferenciacije v DC in vplivajo na uspešnost imunoterapij. Zato je ključno razviti kakovostne kriterije afereze, ki bodo zmanjšali vpliv vnetnih dejavnikov na fenotip monocitov ter izboljšali izhodiščne lastnosti monocitov za imunoterapevtske pristope.

Na podlagi objavljenih podatkov in lastnih izkušenj smo izdelali protokol afereznega odvzema mononuklearnih celic za pripravo imunohibridomov, ki vključuje postopek naročanja, pregled in potrditev primernosti pacientke za aferezni odzem celic, testiranje na označevalce okužb, parametre afereznega odvzema, kontrolo kakovosti produkta, kriteriji sprejemljivosti, pogoje shranjevanja in postopke izdaje.

Pri zdravih prostovoljcih iz registra trombofereznih darovalcev smo v letu 2024 opravili štiri validacijske afereze v skladu z zastavljenim protokolom ki je vključeval prilagoditev parametrov zbiranja kot so faktor centrifugiranja, odstotek antikoagulansa, volumen predelane krvi, prazna vrednost optičnega senzorja, količina afereznega pripravka. Vsi postopki so potekali v skladu s pričakovanji in so bili uspešno zaključeni brez zabeleženih odstopanj.

Odvzeli smo vzorce periferne krvi pred, med in po aferizi, ter vzorec afereznega pripravka med in ob koncu afereze. Osnovna analiza levkaferznega pripravka je vključevala določanje koncentracije levkocitov z diferencialno krvno sliko, eritrocitov in trombocitov. S pretočno citometrijo smo analizirali % aktiviranih trombocitov in % CD14+CD16-HLADR+ monocitov v vzorcu periferne krvi darovalca pred odvzemom, 15 minut po začetku afereze, po zaključku afereze v levkaferznem pripravku. Primerjali smo vzorce odvzete v epruvete z EDTA, ACD in citratom. Rezultati potrjujejo vpliv venepunkcije in antikoagulansa na aktivacijo trombocitov. Pridobljene podatke bomo v nadaljevanju uporabili za primerjavo s pripravki pridobljenimi od bolnic s karcinomom dojke.

Nacionalni raziskovalni program P4-0176 »Sintezna biologija in imunologija« in razvojni steber stabilnega financiranja

PROF. DR. VLADKA ČURIN ŠERBEC

V letu 2024 je raziskovalna skupina Biomedicina pod vodstvom prof. dr. Vladka Čurin Šerbec izvajala delo na raziskovalnem programu P4-0176 »Sintezna biologija in imunologija« skladno z načrtom raziskav in zapisanimi cilji, ki so del dokumentacije, vložene na javni razpis v letu 2021, na katerem je bil omenjeni program izbran za stabilno financiranje v letih 2022 – 2027 in za katerega nam je tedanja ministrica za visoko šolstvo, znanost in šport podelila koncesijo za obdobje trajanja programa, vodja na ZTM je V. Čurin Šerbec.

V letu 2024 smo v okviru raziskovalnega programa P4-0176 in razvojnega stebra stabilnega financiranja izvajali naslednje aktivnosti:

- raziskave in razvoj originalnih zaporedij za pripravo novih CAR-T limfocitov,
- sodelovanje z domačimi in tujimi raziskovalnimi institucijami, ki smo jih v preteklosti vzpostavili v okviru raziskovalnega programa P4-0176 (2004 – 2021),
- nadgradnja pilotne biobanke vzorcev krvi zdravih dajalcev v nacionalno biobanko (določitev kakovosti vzorcev v pilotni biobanki).

Delo na raziskovalnem programu smo predstavili na strokovnih in znanstvenih srečanjih v Sloveniji in v tujini, tudi z vabljenimi predavanji (Strokovno srečanje Združenja hematologov Slovenije, Združenja za transfuzijsko medicino Slovenije, Sekcije medicinskih sester in zdravstvenih tehnikov v hematologiji in Hematološkega laboratorijskega združenja, zbornik povzetkov, Podčetrtek, April 12–13 2024; 8th Slovenian Pneumology, Allergology and Immunology Congress with international participation: April 18–19 2024, Four Points by Sheraton/Mons, Ljubljana; 7th Antibody Validation Workshop, 13th EuroMAbNet Meeting: June 17–19, 2024, Montpellier, France). Zelo uspešno konferenco v Hotelu Mons v Ljubljani smo tudi soorganizirali, imeli smo dve predavanji (V. Čurin Šerbec o biobankah vzorcev krvi zdravih dajalcev kot kritični infrastrukturi ter P. Kern o rezultatih raziskav v okviru doktorske naloge) ter ob zaključku vodenje okrogle mize (V. Čurin Šerbec). Podatki o predstavljenih prispevkih (predavanja, posterji) so dostopni v podatkovni bazi Sicris.

Člani raziskovalne skupine Biomedicina smo avtorji ali soavtorji 2 izvirnih znanstvenih člankov, ki smo ju objavili v letu 2024, eden od njih je v podatkovni bazi Sicris uvrščen med izjemne dosežke (A").

Podatki o objavljenih prispevkih so dostopni v podatkovni bazi Sicris. Naše aktivnosti predstavljamo tudi v internem glasilu ZTM NoviČke.

V novembru 2024 je pod mentorstvom prof. dr. Vladke Čurin Šerbec doktorsko disertacijo zagovarjala Sandra Omejec. Dr. Sandra Omejec je s tem zaključila usposabljanje mlade raziskovalke v okviru raziskovalnega programa P4-0176 in se zaposlila v QC v podjetju Lek/Novartis.

V okviru raziskovalnega programa P4-0176 se je v letu 2024 pod mentorstvom prof. dr. Vladke Čurin Šerbec nadaljevalo usposabljanje mlade raziskovalke Petre Kern.

V jeseni 2024 smo sodelovali pri presoji porabe sredstev ARIS s strain njihove revizorke, ki je vključeval pregled porabe sredstev na nacionalnem raziskovalnem programu P4-0176 v okviru stabilnega financiranja, institucionalni in razvojni steber stabilnega financiranja ter nacionalna raziskovalna projekta in program usposabljanja mladih raziskovalcev.

Mladi raziskovalci

1. Modifikacija mezenhimskih stromalnih matičnih celic iz popkavnice z namenom izboljšanja imunomodulatornih in regenerativnih lastnosti pri zdravljenju artroze
2. Razvoj monoklonskih protiteles proti membranskim proteinom

Modifikacija mezenhimskih stromalnih matičnih celic iz popkovnice z namenom izboljšanja imunomodulatornih in regenerativnih lastnosti pri zdravljenju artroze

ANDREJ KOBOLD

Mentor: prof. dr. Urban Švajger

Terapije z mezenhimskimi stromalnimi matičnimi celicami (MSC) so privlačne za zdravljenje različnih degenerativnih in imunoloških bolezni, vendar je njihova učinkovitost pri ljudeh večkrat omejena. Manjšo učinkovitost zdravil za napredno zdravljenje (ZNZ) na osnovi MSC pripisujemo raznolikim dejavnikom, kot so velika heterogenost MSC, variabilnost med donorji začetnega materiala, različnimi viri MSC in neenotnimi protokoli proizvodnje različnih centrov. K temu zelo verjetno prispeva tudi dejstvo, da klinična uporaba netretiranih MSC v preteklih letih brez ustrezne ex vivo modifikacije njihovega aktivacijskega stanja, ni omogočila optimalnega izkoriščanja njihovega terapevtskega potenciala.

V okviru doktorske naloge želimo razviti nove protokole za bodočo proizvodnjo celičnih zdravil na osnovi MSC naslednje generacije z izboljšano terapevtsko učinkovitostjo v kontekstu zdravljenja artroz. Izboljšanje želimo doseči z in vitro predaktivacijo oz. modifikacijo MSC iz popkovnice z novimi, pred tem neraziskanimi, kombinacijami citokinov in rastnih dejavnikov. Specifičnost in učinkovitost modifikacije nameravamo preveriti na celičnem in vitro modelu artroze.

V prvem delu smo preučevali vpliv modifikacij MSC s posameznimi citokini in rastnimi dejavniki na nivoju izražanja genov (5 referenčnih genov in 15 regenerativnih in imunomodulatornih genov). Na podlagi rezultatov smo izbrali citokine in rastne dejavnike, ki so pozitivno modulirani izražanje največ genov. V nadaljevanju smo izbrane dejavnike združevali z IFN γ , ki je najmočnejši induktor imunomodulatornega encima IDO1, vendar negativno modulira večino preostalih preiskovanih genov. Na koncu nas je zanimalo, ali lahko z različnimi kombinacijami izbranih 4 dejavnikov (BMP2, IL1 β , OSM in TGF β 1), še bolj induciramo tarčne gene v primerjavi z modifikacijami s posameznimi dejavniki. Na podlagi dobljenih rezultatov smo izbrali 4 kombinacije dejavnikov za modifikacijo MSC.

V drugem delu izbrane kombinacije dejavnikov primerjamo z netretiranimi oziroma z IFN γ modificiranimi istovetnimi MSC na nivoju imunofenotipa in s funkcionalnimi testi imunomodulacije in regeneracije. Ugotovili smo, da lahko z določenimi

modifikacijami, ki ne vsebujejo IFNy, dosežemo imunosupresivno funkcijo, ki je primerljiva z IFNy modificiranimi MSC. Preliminarni rezultati testa aktivacije makrofagov nakazujejo, da so izbrane kombinacije dejavnikov učinkovitejše kot netretirane in IFNy modificirane MSC pri zaviranju sproščanja TNF α , hkrati znižajo tudi izražanje določenih kostimulatornih molekul (CD40 in CD80) na makrofagih. V zaključku bomo primerjali modificirane MSC še s funkcijskimi testi s hondrociti, kjer bomo preučevali anti-apoptotično delovanje MSC, vpliv MSC na proliferacijo in izražanje anabolnih in katabolnih markerjev (in vitro modelu artroze).

Razvoj monoklonskih protiteles proti membranskim proteinom

PETRA KERN

Raziskovalni program P4-0176

Delovna mentorica: dr. Valerija Kovač

Mentorica: prof. dr. Vladka Čurin Šerbec

Namen raziskovalnega dela v okviru doktorskega študija Biomedicine je pridobiti in ovrednotiti monoklonska protitelesa proti membranskim proteinom z izborom različnih vrst antigenov za imunizacijo, ter dobro načrtovano selekcijo za izbiro uporabnih protiteles. Pridobiti želimo monoklonska protitelesa, ki se bodo vezala na nativni membranski protein, izražen na celicah, in bodo potencialno uporabna v diagnostične in terapevtske namene.

V letu 2024 smo nadaljevali z delom, ki smo ga začeli v predhodnih letih. V letu 2024 smododatno imunizirali laboratorijske miši, in sicer 3 miši smo imunizirali z rekombinantno ekstracelularno domeno (rECD) membranskega proteina, 3 miši pa z izbranim peptidom, vezanim na nosilni protein KLH (ang. Keyhole limpet hemocyanin). Vseh 6 miši smo žrtvovali in jim odvzeli vranico. Delo z laboratorijskimi živalmi je potekalo v skladu z dovoljenjem etične komisije Uprave Republike Slovenije za varno hrano, veterinarstvo in varstvo rastlin (št. dovoljenja: U34401-21/2021/3). S postopkom fuzije mielomskih in vraničnih celic, ter uporabo selekcijskega gojišča s hipoksantinom, aminopterinom in timidinom (HAT) smo pripravili hibridome, ki izražajo protitelesa proti membranskemu proteinu.

Med procesom primarne selekcije smo testirali skupno 2400 vzorcev. Kandidate, ki smo jih pridobili z imunizacijo miši z rECD membranskega proteina smo testirali v 3 testnih sistemih. Z encimskoimunskim testom (ELISA) smo testirali njihovo vezavo na rECD, ki smo jo uporabili za imunizacijo. Kandidate, ki smo jih pridobili pri imunizaciji s peptidom, vezanim na KLH, smo testirali v 6 testnih sistemih. V ELISA testu smo preverili vezavo na peptid, na peptid vezan na KLH, na KLH in na rECD tarčnega proteina. Vsa pridobljena protitelesa smo testirali še s celičnim ELISA testom, ki smo ga razvili posebej za namen primarnega testiranja. S celičnim ELISA testom smo testirali vezavo kandidatov na dve različni celični liniji, od katerih ena izraža in druga ne izraža tarčnega membranskega proteina.

Na podlagi opravljenih testiranj smo izbrali najboljše kandidate. Naš primarni kriterij za izbiro je bilo razlikovanje med celično linijo, ki izraža tarčni protein, in celično linijo, ki tarčnega proteina ne izraža. Hibridome, ki izražajo ustrezna protitelesa

smo namnožili, zamrznili in pripravili celično banko. Izbrane kandidate smo nato testirali s celičnim ELISA testom še na 4 drugih celičnih linijah in indirektnim sendvič ELISA testom ter jim določili izotip. Ugotovili smo, da sta dva od treh najboljših kandidatov protitelesa razreda IgM, eden pa razreda IgG.

Ker so protitelesa razreda IgM zelo velike molekule, želimo pripraviti manjše fragmente protiteles, ki bi ohranili specifično vezavo na tarčni protein. Zato smo protitelesa očistili s tekočinsko kromatografijo (FPLC, ang. fast protein liquid chromatography). Prav tako smo se lotili pomnoževanja variabilnih regij mišjih IgG in IgM težkih in lahkih verig. Narava rekombinacije in prepisovanja genskega zapisa za imunoglobuline zahteva, da najprej izvedemo reverzno transkripcijo mRNA v cDNA in nato pomnožimo DNA zaporedje, ki predstavlja variabilne regije težkih in lahkih verig protiteles. Zaporedje za variabilne regije protiteles bomo lahko uporabili za rekombinantno izražanje protiteles v kakršnikoli obliki v celičnih kulturah ali iz njih na primer pripravili antigensko vezavno domeno himernega antigenškega receptorja (CAR).

Vzporedno s pripravo protiteles proti membranskim proteinom smo v letu 2024 izvedli še obsežno validacijo celičnega ELISA testa z namenom objave metode v originalnem znanstvenem članku. Celični ELISA test smo primerjali s slikovno pretočno citometrijo. Določali smo občutljivost in specifičnost obeh metod. Pokazali smo, da je celični ELISA test bolj občutljiv od slikovne pretočne citometrije, saj zazna interakcijo med antigenom in protitelesom pri nižji koncentraciji protiteles. Prav tako smo potrdili, da je test specifičen in s tem primeren za primarno presejalno testiranje več sto protiteles na dan. Članek je pripravljen za pošiljanje v recenzijo.

Rezultate svojega dela sem predstavila na dveh kongresih, in sicer v obliki krajšega vabljenega predavanja na Slovenskem pulmološkem, alergološkem in imunološkem kongresu aprila v Ljubljani, ter v obliki posterja na srečanju EuroMAbNet junija v Montpellierju.



Zavod Republike Slovenije
za transfuzijsko medicino
Slovenian Institute for Transfusion Medicine

