

Personaalsetest indutseeritud pluripotentsetest tüvirakkudest saadud dopamiini eellasrakud Parkinsoni tõve ravis

Kudede siirdamist Parkinsoni tõvega patsientidele, et asendada *substantia nigra pars compacta* kaotatud dopaminergilisi neuroneid on uuritud alates 1980. aastatest. Võimalikku allogeenset või ksenogeenset algmaterjali on püütud saada neerupealiste säsi rakkudest ja loote mesentsefaalsest koest. Rakkude võimalikuks allikaks võivad olla ka pluripotentsetest tüvirakkudest pärinevad keskaju dopaminergilised eellasrakud (mDAP-d ehk *midbrain dopaminergic progenitor cells*, mDAPs). Tehnoloogia edusammud indutseeritud pluripotentsete tüvirakkude (iPSC-d ehk *induced pluripotent stem cells*, iPSCs) loomisel ja nende *in vitro* diferentseerumise juhtimisel keskaju dopaminergilisteks rakkudeks annavad lootust saada kasu fetaalse koe transplantatsioonist. Autoloogsete rakkude kasutamine võib lisaks hoida ära immuunsupressiooni vajaduse.

Artiklis kirjeldatud uuringu viisid läbi USA Massachusettsi üldhaigla ja McCleani haigla (*Massachusetts General Hospital and McClean Hospital*) teadlased Ameerika Ühendriikide Toidu- ja Raviameti (*Food and Drug Administration, FDA*) jälgimise all. Patsient andis nõusoleku selle Parkinsoni tõve ravis esmakordselt kasutatava meetodi rakendamiseks. Temaga arutati eelnevalt läbi võimalikud kaasuvad riskid ning anti ülevaade praegu kasutusel olevatest kliinilistest ja kirurgilistest ravivõimalustest, k.a aju süvastimulatsioon.

iPSC-de erinevate liinide loomiseks vajalikud fibroblastid koguti nahabiopsia abil, neid testiti pluripotentsete jagunemise suhtes *in vivo* ja *in vitro* ning skriiniti kogu eksoomi sekveneerimise abil. Edasisteks uuringuteks ja mDAP-de tootmiseks valiti

üksik iPSC kloon (määratletud kui C4) kooskõlas hea tootmistavaga.

C4 iPSC-põhised rakud olid normaalse karüotüübiga. Eellasrakkude osas tehti kogu genoomi sekveneerimine – tulemused kinnitasid neis teadaolevate kasvajaga seotud ja neurodegeneratsiooniga seonduvate mutatsioonide puudumist. Enne kliinilist kasutamist veenduti, et eellasrakkudest saadud neuronitel oli *in vitro substantia nigra pars compacta* dopaminergilistele neuronitele iseloomulik võime dopamiini sekretsiooniks ja sarnased neurofüsioloogilised omadused ning need neuronid näitasid loomudelites fetaalset päritolu keskaju koele sarnast funktsionaalset tõhusust. Pärast ravi kvartsetiiniga ei olnud lõplikul rakutootel (28. päeval) tuvastatavat diferentseerumata iPSC-de jääki ei immuunspetsiifilise värvimise ega polümeraasi ahelreaktsiooni analüüsi alusel. Samuti ei tuvastatud lõpptootes serotonergilisi neuroneid, mis võivad olla siiratud rakkude tekitatud düskineesiaste põhjuseks.

Patsiendipõhiseid iPSC-sid (C4) ja allogeenseid inimembrüote tüvirakke (H9) lasti jaguneda 28 päeva (C4-mDAP-d ja H9-mDAP-d). Seejärel siirati 1×10^5 rakku mõlemast rühmast mitteülekaaluliste diabeediga raske kombineeritud immuundefitsiidid ja vähenenud interleukiin-2 gammaretseptoritega hiirte (NOD-SCID-gammahiired), humaniseeritud NOD-SCID-gamma-hiirte (C4-hu) ja allogeensete humaniseeritud hiire (K1-hu) *striatum*'isse. Loomad surmati 2 nädala pärast ja siiratud rakke uuriti histoloogiliselt, märgistades inimese neuraalsete rakkude adhesiooni molekuli rakke (hNCAM+) ning jälgides, kas siiratud neuronitel olid markerid dopaminergiliste neuronite (türo-

siinhüdroksülaasi [TH+] neuronid) ja rakulise immuunvastuse (CD4+ rakud) suhtes.

Tulemused

NOD-SCID-gamma-hiirte säilisid nii patsiendipõhised mDAP-d (C4-mDAPs) kui ka allogeensed mDAP-d (H9-mDAP-d). Samas esines pärast transplantatsiooni allogeensetele humaniseeritud hiirtele (K1-hu) äratõukereaktsioon. Humaniseeritud hiirte (C4-hu) jäid autoloogsed C4-mDAP-d ellu, siirikud värvusid positiivselt hNCAM+ (*human neural cell adhesion molecule*, inimese neuraalse raku adhesioonimolekul) rakkude suhtes ja sisaldasid TH+ (türosiinhüdroksülaas) neuroneid 2 nädalat pärast implantatsiooni, samal ajal kui C4-hu hiirte allogeensed H9-mDAP-d hävinesid ja neil esinesid väljendunud CD4+ lümfotsütaarsed infiltraadid.

Haigusjuht

Patsient oli 69aastane paremakäeline mees 10 aastat kestnud progresseeruva idiopaatilise Parkinsoni tõve anamneesiga, kes sai raviks pikatoimelist karbidopa-levodopat (23,75 mg ja 95 mg kapslites, annuses 3 kapslit neli korda päevas), rotigotiini (4 mg päevas) ja rasagiliini (1 mg päevas), päevane levodopa ekvivalentne koguanus 904 mg. Sümptomid olid sellele vaatamata halvasti kontrollitud, päevas esines 3 tundi nn *off*-perioodi, mille ajal süvenesid treemor ja posturaalne ebastabiilsus ning halvenes kontroll liigutuste üle, levodopa annuse suurendamine põhjustas ortostaatilist hüpotensiooni. Düskineesiaid patsiendil ei esinenud.

Patsiendi neuroloogiline läbivaatus ja Parkinsoni tõve raskuse hindamine skaalade abil viidi läbi

uuringu alguses ning 1, 3, 6, 9 ja 12 kuud pärast iga siirdamist ning seejärel iga 6 kuu järel. Igal läbivaatusel hinnati patsiendi nn *off*-perioodi, kui motoorsed sümptomid ei olnud patsiendi seisukohalt ravimi abil adekvaatselt kontrollitud. Küsimustikest kasutati Parkinsoni tõve ühtlustatud hindamise skaala (*Movement Disorders Society Unified Parkinson's Disease Rating Scale*, MDS-UPDRS) 3. osa.

Patsiendile tehti kaks stereotaktilist kirurgilist protseduuri rakkude implantatsiooniks *putamen*'isse, enne vasakusse hemisfääri ning 6 kuu pärast ka paremasse hemisfääri. Igal operatsioonil tehti kolm kirurgilist trajektoori *putamen*'i tagaosast eesmise komissuurini, mis läbisid tuuma ülemise-alumise piirkonna. Iga protseduuri ajal viidi ajju 4 miljonit raku, jagades neid võrdselt kolme raja vahel. Perioperatiivselt manustati veenisisesi tsefasoliini. Immunosupressante, glükokortikoide või antikonvulsante ei kasutatud.

Operatsiooni ajal tehti pea KT (kompuutertomograafia) uuring, et olla kindel rakkude õigesse kohta paigutamises *putamen*'is, ja samuti pärast operatsiooni, et hinnata võimalikke tüsistusi (hemorraagiaid). MRT- (magnetresonantsomograafia) uuringute ja MR-spektroskoopiade abil välistati ajutuumor, insult või hemorraagia. Lisaks tehti mitmed ¹⁸F-DOPA ([¹⁸F] 6-fluoro-3,4-dihüdroksü-L-fenüülalaniin) positronemisioontomograafia (PET) uuringud, et hinnata presünaptilist dopamiini aktiivsust siiratud rakkudega *putamen*'i piirkondades.

Kolm kuud pärast esimest implantatsiooni näitas ¹⁸F-DOPA PET-KT-uuring ¹⁸F-DOPA sisalduse vähenemist *putamen*'ites võrreldes algtasemega. Sellele järgnes väike F-DOPA sisalduse suurenemine hilisemates uuringutes (18 ja 24 kuu pärast). Kuus kuud pärast esimest implantatsiooni ja hiljem tehtud MRT-uuringud näitasid T2-signaali tõusu siirikute piirkonnas *putamen*'is ning kirurgiliselt loodud valgeaine traktides, enam paremal. Lisaks oli ühe trakti kohal 3 mm kõrgusel nähtav 4-mm läbimõõduga

kontrastaine kogunemise ala, mis oli iseloomulik operatsioonijärgsele gliosile.

24 kuud pärast esimest implantatsiooni (vasakul) ja 18 kuud pärast teist (paremal) ei kaevanud patsient ei kõrvaltoimete ega funktsiooni halvenemise üle. MDS-UPDRSi 3. osa skoor (millega hinnati motoorseid funktsioone ning kus suurem skoor näitab raskemat haigust) oli 4. nädalal pärast esimest implantatsiooni 43, järgnevatel kindlaks määratud ajal tehtud hindamistel 33 kuni 41 ja 24 kuu pärast 33 punkti. PDQ-39 skoor (*39-item Parkinson's Disease Questionnaire*, Parkinsoni tõvega haigete elukvaliteedi küsimustik, kus väiksemad skoorid näitavad paremat kvaliteeti) oli implanteerimise ajal 62, järelperioodis 2 kuni 34 ja 24 kuu pärast 2.

24 kuu pärast oli patsiendi levodopa päevane ekvivalentne annus 847 mg, mis näitas 6%-list vähenemist võrreldes implanteerimiseelse ajaga. Tal esines päevas alla ühe tunni kestvat nn *off*-aega. Düskineesiaid ei olnud.

Radioloogilised uuringud näitasid, et kaks *putamen*'itesse viidud siirikut püsisid seal 24 kuud (vasakus pooles) ja 18 kuud (paremas pooles). F-DOPA PET signaali paranemine oli tagasihoidlik, kuid enam väljendunud siiratud rakkude ümber *putamen*'i tagaosas – subregioonis, mille rakkude degeneratsioon on Parkinsoni tõvele iseloomulik.

Motoorse funktsiooni ja patsiendi hinnatavate skaalade tulemuste paranemist kirjeldatud patsiendil tuleks hinnata ettevaatlikkusega, sest nii patsient kui ka hindajad olid interventsioonist teadlikud ning kontrollrühma võrdluseks ei olnud. Kliinilised muutused ilmnesid vähehaaval 18 kuni 24 kuu jooksul pärast implantatsiooni, see ajapiirang on kooskõlas *putamen*'i järkjärgulise reinnervatsiooniga dopaminergiliste neuronite poolt. Selle aja jooksul vähenes dopamiini päevane annus 6% – see vähenemine on tegelikult kliiniliselt ebamäärane. Fetaalse koe transplantatsiooni uuringud on näidanud, et tulemuste hindamine

siiratud rakkude pikaajalise ellujäämise ja kliinilise toime kohta võib vajada pikemat jälgimisperioodi. MRT- ja PET-uuringute leiud ning kliinilise seisundi paranemine olid enam seotud paremal pool (teisena) tehtud protseduuriga kui vasakul, ilmselt oli see seotud ka protseduuri osavama teostamisega teise implantatsiooni korral, kaasa arvatud lühem aeg rakkude kogumisest kuni implantatsioonini.

On ebaselge, kas kesknärvisüsteemi immuunsüsteem reageeriks erinevalt iPSC-dest tuletatud autoloogsetele mDAP-dele võrreldes allogeensetega. Autoloogsete rakkude ravi üks eesmärk on hoiduda vajadusest teadmata pikkusega immunosupressiooniks, mida kasutatakse mitteautoloogsete kudede puhul. Kirjeldatud patsiendi ravi käigus immunosupressiooni ei kasutatud, lähtudes hüpoteesist, et kasutatud fibroplastide autoloogne päritolu laseb implanteeritavat rakukogumikku tunnetada organismi koe osana. Kirjeldatud eksperimendid siiratud rakkude ellujäämisest autoloogsetel võrreldes allogeensete humaniseeritud hiirtega toetavad seda hüpoteesi. Autoloogsete rakkude kasutamine on kallim ja töömahukam, vajades rakuliinide tootmist ja testimist ohutuse suhtes enne iga kasutamist.

Artikli lõpus on autorid rõhutanud edasiste uuringute vajadust, et selgitada, kuidas see teraapia võiks toimida erineva geneetilise tausta ja haiguse fenotüübiga patsientidel, samuti peaks jälgimisperiood olema pikem kui 24 kuud.

REFEREERITUD

Schweitzer JS, Song B, Herrington TM, et al. Personalized iPSC-derived dopamine progenitor cells for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2020;382:1926–32.



Marju Herodes –
TÜ närvikliinik