

Streszczenie rozprawy doktorskiej pt.

„Transplantacja ludzkich progenitorów neuralnych krwi pępowinowej do mózgu szczura po uszkodzeniu ouabainą: wzajemne oddziaływanie komórek dawcy i biorcy”

Odkrycie neuralnych komórek macierzystych (NSC) o właściwościach neurogennych w mózgu dorosłych osobników otworzyło możliwości repopulacji uszkodzeń OUN. Wyniki badań ostatnich lat wykazały aktywną neurogenezę w strefach neurogennych i zdolność migracji powstałych neuroblastów u ludzi, co świadczy o możliwości powstawania nowych neuronów w ciągu całego okresu życia. Pomimo istnienia neuralnych komórek macierzystych, OUN ma ograniczoną zdolność samoodnowy, szczególnie w stanach patologicznych. Uszkodzenie mózgu spowodowane niedokrwieniem stymuluje proliferację endogennych progenitorów neuralnych, jednak większość nowopowstałych komórek obumiera w ciągu pierwszych kilku tygodni po udarze, stąd koncepcja wspomagania odbudowy zniszczonych struktur poprzez zastosowanie egzogennych komórek macierzystych wydaje się być wielką nadzieją w leczeniu chorób neurologicznych.

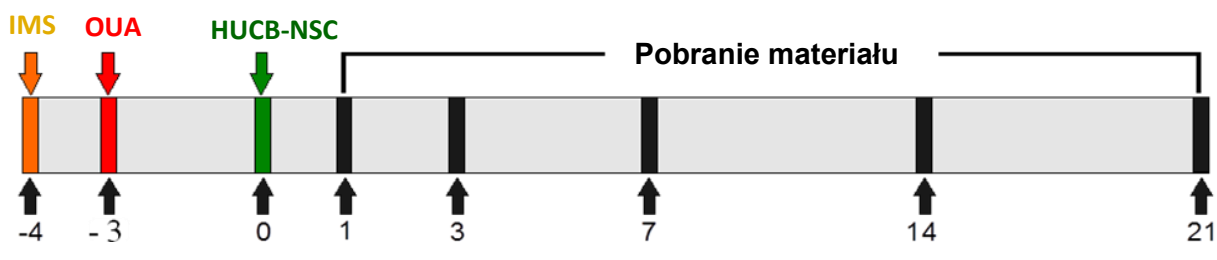
Terapia regeneracyjna nieodwracalnie uszkodzonych tkanek za pomocą przeszczepów komórek macierzystych skupiła uwagę środowisk medycznych i opinii publicznej z chwilą opracowania przez Thomsona w roku 1998 metody otrzymywania i długotrwałej hodowli ludzkich komórek embrionalnych (ESC). Nieograniczony wzrost ESC *in vitro* i ich zdolność różnicowania we wszystkie komórki organizmu sprawia, że stanowią przedmiot zainteresowania wielu naukowców. Jednak te cechy niosą ze sobą zagrożenie powstania nowotworów po przeszczepie komórek embrionalnych *in vivo*. Niestabilność genetyczna ESC oraz ograniczenia etyczno-prawne w pozyskiwaniu komórek z zarodków i płodów ludzkich sprawiły, że zaczęto poszukiwać komórek macierzystych o potencjale neuralnym poza OUN. Bogatym źródłem komórek macierzystych okazała się krew pępowinowa, z uwagi na zawartość progenitorów będących na wcześniejszym etapie rozwoju, bardziej plastycznych i mniej immunogennych w porównaniu z innymi tkankami.

Dotychczasowe wyniki naszych badań eksperymentalnych *in vitro* z udziałem komórek z krwi pępowinowej są bardzo obiecujące, jednak wprowadzenie egzogennych komórek macierzystych do kliniki w celu leczenia chorych po udarze wymaga badań przedklinicznych przeprowadzonych na zwierzętach laboratoryjnych. Postęp w tej dziedzinie zależy od opracowania modeli eksperymentalnych pozwalających na długotrwałe przeżycie przeszczepionych komórek w celu zbadania mechanizmów odpowiedzialnych za procesy proliferacji i różnicowania oraz tworzenie struktur nerwowych w mózgu biorców.

Celem moich badań była ocena działania ludzkich neuralnych komórek macierzystych krwi pępowinowej po ich przeszczepie u szczurów poddanych uszkodzeniu mózgu oraz prześledzenie *in vivo* wzajemnych relacji komórek dawcy i biorcy

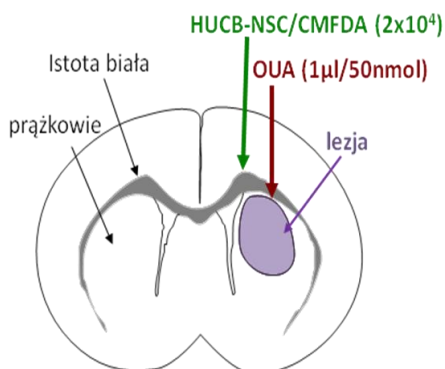
Przedmiotem badań były neuralne komórki macierzyste ustalonej nietransformowanej linii wyprowadzonej w naszym zakładzie z ludzkiej krwi pępowinowej (HUCB-NSC). Wybrany model cytotoksycznego uszkodzenia mózgu z zastosowaniem inhibitora pompy sodowo-potasowej (ouabainy) odpowiada w klinice niewielkim uszkodzeniom struktur głębokich mózgu, które ze względu na swoją lokalizację powodują znaczące i trudno poddające się rehabilitacji deficyty neurologiczne.

Badania wykonano u dorosłych szczurów szczepu Wistar (samców) w wieku 3 miesięcy o ciężarze ciała 250-280 g pochodzących z Charles River Sulzfeld, hodowanych w zwierzętarni naszego Instytutu, według następującego schematu:



IMS–immunosupresja; OUA-uszkodzenie mózgu ouabainą; HUCB-NSC–przeszczep komórek

Po podaniu ouabainy do prążkowie szczura (model cytotoksycznego uszkodzenia mózgu) wstrzykiwano do istoty białej ludzkie progenitory neuralne krwi pępowinowej (HUCB-NSC)



Cel pracy doktorskiej był realizowany w oparciu o badania *in vivo* dotyczące:

- oceny przeżycia, proliferacji, różnicowania i migracji ludzkich neuralnych komórek macierzystych z krwi pępowinowej (HUCB-NSC) przeszczepianych do istoty białej mózgu szczura, w eksperymentalnym modelu uszkodzenia prążkowie ouabainą
- charakterystyki parametrów wrodzonej i adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej w mózgu biorców przeszczepu HUCB-NSC po zastosowaniu różnych metod immunosupresji
- oceny procesów endogennej neurogenezy w rejonach SVZ i SGZ mózgu szczura oraz aktywności metaloproteinaz po uszkodzeniu prążkowie ouabainą i transplantacji HUCB-NSC
- identyfikacji endogennych (pochodzenia biorcy) i egzogennych (pochodzenia dawcy) czynników neurotroficznych/neuroprotektynnych obecnych w mózgu szczura po uszkodzeniu prążkowie ouabainą i przeszczepieniu komórek HUCB-NSC

Do oceny endogennych i egzogennych komórek w mózgu szczura stosowano metody immunohistochemiczne i wizualizację w mikroskopie konfokalnym, do określenia aktywności metaloproteinaz technikę zymografii *in situ*, do analizy ekspresji genów reakcje RT-PCR i RT-PCR w czasie rzeczywistym (RealTime RT-PCR). Materiał stanowiły mózgi szczura pobierane od zwierząt doświadczalnych w sekwencji czasowej 1 - 21 dni po przeszczepie HUCB-NSC zgodnie z protokołem określonym dla poszczególnych badań eksperymentalnych.

Otrzymane wyniki pozwalają podsumować dotychczasowe badania:

- Przeszczepione do mózgu dorosłego szczura ludzkie progenitory neuralne krwi pępowinowej (HUCB-NSC) w większości pozostają w miejscu wszczepu, mają niski stopień proliferacji i ograniczoną zdolność migracji. Nie wykazują ekspresji antygenów typowych dla dojrzałych neuronów, krótko przeżywają w mózgu biorców, są eliminowane po 10-14 dniach
- Analiza parametrów miejscowej odpowiedzi immunologicznej w mózgu szczurów po uszkodzeniu ouabainą i transplantacji HUCB-NSC wskazuje na pobudzenie efektorów zarówno wrodzonej (nieswoistej) jak i adaptacyjnej (swoistej) reakcji gospodarza. Zastosowanie immunosupresji (CsA; CsA+DepoMedrol+Azatioprina) i odczulania biorców nie wpływa na wielkość odpowiedzi immunologicznej i nie przedłuża przeżycia przeszczepu
- Przeszczep komórek ludzkich (HUCB-NSC) w postaci 3D agregatów na platformach polimerowych zapewnia przeżycie komórkom dawcy ograniczając odczyn zapalny. Pozostające wewnątrz struktur komórki są żywe, dzielą się, różnicując w młode neurony, jednak nie opuszczają swojej „niszy” i nie migrują do tkanki, a po biodegradacji szkieletów są eliminowane z mózgu biorców
- Pobudzenie neurogenezy w mózgu szczura po uszkodzeniu ouabainą jest dodatkowo wzmocnione przez przeszczep ludzkich progenitorów neuralnych (HUCB-NSC). Wraz ze wzrostem proliferujących w strefach SVZ i SGZ endogennych komórek, obserwuje się zwiększenie liczby migrujących w kierunku uszkodzenia neuroblastów i podwyższenie aktywności metaloproteinaz
- Transplantacja komórek ludzkich (HUCB-NSC) u zwierząt po ischemii powoduje dodatkowo zwiększenie poziomu endogennych czynników neurotroficznych stymulowanych wcześniej uszkodzeniem OUN. Przeszczepione progenitory neuralne są także źródłem ludzkich czynników troficznych, których obecność stwierdza się w mózgu biorców po transplantacji

i sformułować następujące wnioski:

- Krótkotrwałe przeżycie ludzkich progenitorów neuralnych po ich przeszczepieniu do mózgu szczurów nie pozwala na podjęcie funkcji repopulacji uszkodzonych struktur nerwowych z uwagi na szybką eliminację komórek dawcy przez komórki immunologiczne gospodarza
- W świetle naszych badań pozytywne efekty transplantacji komórek obserwowane wcześniej w testach behawioralnych są wynikiem pośredniego działania egzogennych komórek (uwalnianie czynników wzrostu, neuromorfenów, czynników antyapoptotycznych i immunomodulacyjnych), korzystnego z punktu widzenia stymulacji endogennych procesów naprawczych w uszkodzonej tkance
- Zapewnienie optymalnego mikrośrodowiska do proliferacji, migracji i różnicowania endogennych progenitorów neuralnych, a także ochronnego działania w stosunku do dojrzałych neuronów wydaje się najważniejszym celem terapii z zastosowaniem przeszczepów komórek somatycznych w chorobach OUN

Wyniki zamieszczone w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały częściowo opublikowane w następujących pracach:

- **Jablonska A.**, Janowski M, Lukomska B. Different Methods of Immunosuppression do not prolong the survival of human umbilical cord blood derived neural stem cells transplanted into focal brain injured rats. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 2013;73(1):
IF=2.110
- Janowski M, **Jablonska A.**, Kozłowska H, Orukari I, Bernard S, Bulte JW, Lukomska B, Walczak P: Neonatal desensitization does not universally prevent xenograft rejection". *Nature Methods* 2012;9:856-858 (**I i II autor są równoważni**)
IF=19.276
- Jurga M, Dainiak M, Sarnowska A, **Jablonska A.**, Tripathi A, Plieva FM, Savin I, Strojek L, Jungvid H, Kumar A, Lukomska B, Domanska-Janik K, Forraz N, McGuckin C: New bioactive cryogel scaffolds for in vitro neural tissue engineering and in vivo transplantation. *Biomaterials* 2011;32:3423-3434
IF=7.365
- **Jablonska A.**, Lukomska B: Stroke induced brain changes: implications for stem cell transplantation. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 2011;71(1):74-85
IF=2.110
- **Jablonska A.**, Kozłowska H, Domanska-Janik K, Lukomska B: Transplantation of neural stem cells derived from human cord blood to the brain of adult and neonatal rats. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 2010;70(4):337-350
IF=1.533