Katarzyna Drela

Zakład Neurobiologii Naprawczej

i Pracownia Bioinżynierii Komórek Macierzystych

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej

Im. Mirosława Mossakowskiego PAN

 Streszczenie rozprawy doktorskiej

**Ocena potencjału neurogennego ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z różnych źródeł: krwi i sznura pępowinowego oraz szpiku kostnego**

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Krystyna Domańska-Janik

Mezenchymalne komórki macierzyste (MSC) pochodzące z organizmów dojrzałych to komórki stosunkowo łatwe do wyizolowania i utrzymania w warunkach hodowli *in vitro.* MSC mają duże zdolności plastyczne, mogą różnicować się do komórek tkanki chrzęstnej, kostnej oraz tłuszczowej. Ostatnie doniesienia sugerują również zdolność tych komórek do nietypowego różnicowania się w komórki innych niż mezodermalne listków zarodkowych np. do pochodzących z ektodermy neuronów. Komórki MSC można znaleźć w szpiku kostnym, a także w wielu innych tkankach i narządach. Podejmowane są również próby wykorzystania tkanek pozostałych po porodzie tzw. tkanek popłodu wliczając w to galaretę Whartona oraz krew pępowinową. Terapia mezenchymalnymi komórkami macierzystymi budzi ogromne nadzieje dla zastosowania ich w medycynie regeneracyjnej. W badaniach na zwierzętach udokumentowano terapeutyczne działanie komórek MSC w modelach wielu chorób. Oprócz ich ogólnoustrojowego działania związanego z wydzielaniem biologicznie ważnych czynników wpływających korzystnie na endogenne procesy naprawcze, przeszczepione MSC mogą wykazywać potencjał do zastępowania uszkodzonych tkanek i komórek.

W przedstawionej rozprawie podjęto próbę opracowania wydajnej metody izolacji a następnie hodowli mezenchymalnych komórek macierzystych otrzymywanych z tkanek niedojrzałych (galarety Whartona sznura pępowinowego oraz krwi pępowinowej) i tkanek dorosłych (szpiku kostnego). W toku realizacji pracy ustalono parametry dla hodowli tych rodzajów MSC, określano stan ich zróżnicowania i właściwości plastyczne a następnie analizowano zdolności do różnicowania neuralnego.

Charakterystyka otrzymanych populacji komórek obejmowała ich ocenę pod kątem obecności specyficznych markerów mezenchymalnych oraz potencjału do różnicowania w komórki mezodermy. Z dwóch analizowanych źródeł udało się uzyskać homogenną frakcję komórek MSC (WJ-MSC, BM-MSC), co zostało potwierdzone pozytywną ekspresją markerów typowych dla MSC zatwierdzonych przez Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej. Zastosowana charakterystyka oceny fenotypu mezenchymalnego nie wykazała różnic pomiędzy analizowanymi frakcjami pochodzącymi ze szpiku kostnego oraz galarety Whartona. Natomiast uzyskana populacja komórek MSC z krwi pępowinowej okazała się stosunkowo nieliczna i trudna do izolacji, co spowodowało wykluczenie tego źródła jako materiału do dalszych analiz. Populacja komórek krwi pępowinowej oprócz potwierdzonych badaniami immunocytochemicznymi cech MSC charakteryzowała się obecnością wielu dodatkowych heterogennych frakcji komórek jednojądrzastych (MNC). Podczas dalszej charakterystyki wyizolowana frakcja komórek krwi pępowinowej wykazywała cechy pluripotencjalne potwierdzone obecnością zestawu genów SRTF (Oct3/4, Sox2, Rex1, Nanog). Nasza obserwacja w pełni pokryła się z danymi literaturowymi, w których autorzy zwracają uwagę na trudności w otrzymywaniu czystej populacji tych komórek MSC i sugerują wykorzystanie do transplantacji całej frakcji komórek MNC krwi pępowinowej.

Z niektórych danych literaturowych wynika, że MSC pochodzące z tkanek popłodu, w tym krwi pępowinowej i galarety Whartona, są dzięki swojej niedojrzałości rozwojowej bardziej pierwotne i o szerszych możliwościach do wielokierunkowego różnicowania w porównaniu z tymi izolowanymi z tkanek dorosłych organizmów. W naszych badaniach zaobserwowaliśmy, że komórki wyizolowane z galarety Whartona wykazują ekspresję markera wczesnej mezodermy Brachyury. Kolejną cechą, potwierdzającą mniej zróżnicowany charakter komórek WJ-MSC, była zaobserwowana na wczesnych etapach hodowli wyższa ekspresja antygenu SSEA-4 uważanego za marker pluripotentnych komórek niezróżnicowanych. Komórki pochodzące z tkanki dorosłej ze szpiku kostnego, charakteryzowały się stosunkowo niższą ekspresją tego markera oraz brakiem Brachyury. Inną obserwacją, potwierdzającą mniej zróżnicowany charakter komórek otrzymanych z galarety Whartona, była obecność charakterystycznych skupisk komórek tworzących kolonie zwane również centrami intensywnej proliferacji. Przeciwnie w komórkach ze szpiku nie udało się ich zaobserwować.

W kolejnych etapach prowadzonych badań porównywano otrzymane populacje komórek pod kątem zdolności do różnicowania w kierunku komórek z linii neuralnej. Jest to kluczowe w poszukiwaniu najlepszego źródła do zastosowań potencjalnie terapeutycznych w chorobach neurologicznych, w których obecnie nie ma skutecznych metod leczenia. Otrzymane przez nas wyniki wykazały duże zdolności do różnicowania neuralnego komórek pochodzących z galarety Whartona. W standardowych warunkach hodowli WJ-MSC spontaniczne nabywały ekspresji markerów neuralnych. Na wczesnych etapach hodowli zaobserwowano pojawianie się markera progenitorów neuroektodermalnych Nestyny, a następnie w trakcie kolejnych pasaży neurofilamenu NF-200 oraz kwaśnego białka włókienkowego GFAP. Przeciwnie, frakcja komórek MSC otrzymanych ze szpiku charakteryzowała się tylko pojedynczymi komórkami nestyno-pozytwnymi, które w dalszej hodowli zanikały i nie nabywały kolejnych cech neuralnych. Wyższy, w porównaniu do BM-MSC, potencjał komórek z WJ-MSC do różnicowania w kierunku neuralnym korelował pozytywnie ze zwiększoną transkrypcyją genów dla panelu czynników neurotroficznych, a w szczególności dla BDNF, GDNF, VEGF, HGF, NT3 i NT4.

W dalszych badaniach podjęto próbę oceny wpływu zastosowania warunków obniżonego 5% tlenu na komórki MSC poddane długotrwałej ekspozycji w kontekście indukcji cech pluripotencjalności. Na podstawie danych literaturowych można wywnioskować, że mezenchymalne komórki macierzyste powinny być hodowane w warunkach, które odzwierciedlają środowisko niszy, z której pierwotnie pochodzą. Odzwierciedlenie naturalnego środowiska niszy może zwiększać proliferację i wpływać pozytywnie na właściwości plastyczne komórek macierzystych. Jak zaprezentowano w badaniach własnych, zastosowane warunki 5% stężenia tlenu w hodowli *in vitro* mezenchymalnych komórek macierzystych było ważnym czynnikiem utrzymującym podziały komórkowe na intensywnym poziomie oraz prowadziło do przedłużenia hodowli obu typów analizowanych komórek. Jednak populacja komórek uzyskanych z tkanki niedojrzałej WJ-MSC wykazywała dużo silniejszą reakcję proliferacyjną na zastosowane warunki obniżenia stężenia tlenu. Ponadto, reakcji komórek WJ-MSC na obniżone stężenie tlenu towarzyszyła indukcja transkrypcji genów podjednostki alfa czynnika HIF-1 i czynnika HIF-2.

W komórkach WJ-MSC w powyższych warunkach oceniano również ekspresję genów charakterystycznych dla komórek pluripotencjalnych oraz genów związanych z różnicowaniem neuralnym. Jedynym ze znaczących wyników odróżniającym hodowle komórek WJ-MSC z niskiego tlenu okazał się zanik cech neuralnych w tym neurofilamentu NF200 oraz GFAP, który wcześniej komórki spontanicznie nabywały w warunkach atmosferycznej zawartości tlenu. Ponadto, co najbardziej istotne, komórki WJ-MSC ulegały stopniowemu odróżnicowaniu i wykazywały ekspresję typowych dla pluripotencjalności markerów SRTF (Oct3/4, Sox2, Rex1, Nanog). Komórki populacji szpikowej wykazały brak reakcji odróżnicowania w wyniku zastosowania obniżonych warunków tlenu, nie stwierdzono u nich indukcji żadnego z badanych genów pluripotencjalności.

W dalszych badaniach uwaga została skupiona na zagadnieniach związanych z mechanizmami kontrolującymi stan epigenomu w kontekście regulacji ważnych procesów rozwojowych, różnicowania i podziałów komórkowych. Czynnikiem modyfikującym, który zastosowano był inhibitor enzymów katalizujących deacetylację histonów (HDAC) Trichostatyna A (TSA). Trichostatyna A jest silnym, odwracalnym inhibitorem deacetylazy i zapobiega usuwaniu grup acetylowych z reszt lizynowych na histonach. Ostatnio coraz powszechniejszy jest pogląd, że hamowanie aktywności HDAC przez ten związek umożliwia acetylację białek histonowych w odcinkach promotorowych genów związanych z procesem różnicowania komórek macierzystych. W naszych doświadczeniach komórki WJ-MSCNT poddane działaniu inhibitora HDAC, TSA w warunkach hipoksji hamowały proliferację w mechanizmie zależnym od indukowanego hipoksją czynnika HIFα 1 i 2. Modyfikator ten również wykazał wpływ na proces różnicowania neuralnego komórek WJ-MSC. Zaobserwowano, że komórki WJ-MSCNT po potraktowaniu TSA odzyskiwały potencjał różnicowania neuralnego. Z naszych badań wynika, że WJ-MSCNT jedynie po wstępnej ekspozycji na TSA reagowały pozytywnie na klasyczne induktory różnicowania neuralnego: cAMP, BDNF, RA, wytwarzając sieć o morfologicznych cechach neuronalnych, utworzoną z komórek wykazujących wysoką ekspresję MAP2, markera dojrzałych neuronów. Przeprowadzone badania wskazują na szczególną rolę poziomu acetylacji białek histonowych zależnych od warunków tlenowych w indukcji pluripotencjalności i w procesie różnicowania w kierunku fenotypów neuralnych mezenchymalnych komórek macierzystych. Badanie zachowania mezenchymalnych komórek macierzystych w hodowli *in vitro* mogą dostarczyć istotnych informacji na temat ich potencjalnych zdolności regeneracyjnych oraz reakcji na poszczególne cząsteczki sygnałowe, kierujące procesem związanym z różnicowaniem neuralnym. Poznanie wpływu różnych czynników na zachowanie komórek mezenchymalnych może pozwolić na ich precyzyjną manipulację i wybór najlepszego źródła komórek w celu wykorzystania w terapii schorzeń układu nerwowego. Nasze badania wykazały ogromną plastyczność komórek otrzymanych z galarety Whartona oraz możliwość uzyskania z nich komórek o zróżnicowanych fenotypach neuralnych, predestynując ten typ mezenchymalnych komórek macierzystych do zastosowań neurologicznych. Komórki z galarety Whartona stanowiły również korzystniejsze źródło do terapii ze względu na stosunkowo większy neurotroficzny efekt parakrynny. Wnioski wypływające z przeprowadzonych badań wskazują na wyjątkową przydatność hodowli WJ-MSC pochodzącej z tkanki o cechach płodowych do terapii komórkowej chorób układu nerwowego.