

# 1. Streszczenie polskojęzyczne

Komórki macierzyste (KM) stanowią podstawę tzw. terapii komórkowej stosowanej w medycynie regeneracyjnej. Jej pierwotnym założeniem miało być zastąpienie uszkodzonych komórek nowymi, wywodzącymi się z przeszczepionych KM, zdolnymi do funkcjonalnego różnicowania. Największą potencję w tym kierunku posiadają komórki o charakterze pluripotencjalnym, tzn. takie które wykazują zdolność od różnicowania w funkcjonalne komórki wywodzące się z wszystkich trzech listków zarodkowych (ektodermy, mezodermy oraz endodermy). Do komórek pluripotencjalnych należą zarodkowe komórki macierzyste (*embryonic stem cells*, ESC) oraz indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (*induced pluripotent stem cells*, iPSC). Jednakże ich szeroki potencjał do różnicowania wiąże się także ze zdolnością do nieograniczonej proliferacji, a co za tym idzie – ryzykiem tumorigenezy. Jako alternatywę proponuje się stosowanie dorosłych (somatycznych) KM, które niestety cechuje węższy potencjał do różnicowania, ograniczony zazwyczaj do jednego z listków zarodkowych. Jedną z szeroko badanych grup somatycznych KM są mezenchymalne komórki macierzyste/zrębowe (MSC). Są one klasyfikowane jako multipotencjalne ze względu na zdolność do różnicowania w komórki wywodzące się z mezodermalnego listka zarodkowego, tj. osteocyty, chondrocyty i adipocyty. Jednakże badacze donoszą o możliwości różnicowania MSC w komórki wywodzące się z innych listków zarodkowych, np. w neurony (wywodzące się z ektodermy) czy w hepatocyty (wywodzące się z endodermy). Dodatkowo, pod wpływem określonych warunków środowiskowych MSC wykazują ekspresję genów typowych dla komórek pluripotencjalnych, choć na znacznie niższym poziomie. Te nietypowe dla komórek multipotencjalnych cechy tłumaczone są wysoką heterogennością populacji MSC i obecnością komórek o bardzo różnym stopniu zróżnicowania. Inna z proponowanych teorii tłumaczy obserwowane zjawisko odmiennym pochodzeniem rozwojowym pojedynczych komórek w stosunku do całej populacji, które zasiedliły mezenchymę w wyniku migracji z innych struktur, np. cewy nerwowej.

W niniejszej rozprawie doktorskiej podjęto próbę zweryfikowania hipotezy badawczej dotyczącej obecności subpopulacji komórek o charakterze pluripotencjalnym w heterogennej populacji MSC. W ramach pracy analizowano czynniki pozwalające na wyodrębnienie komórek przejawiających niezróżnicowany charakter, cechujących się wysokim potencjałem do proliferacji i samoodnowy, podwyższoną ekspresją genów pluripotencjalnych (*SOX2*, *OCT3/4*, *NANOG*) w stosunku do populacji wyjściowej MSC oraz zdolnością do różnicowania w kierunku komórek wywodzących się ze wszystkich trzech listków zarodkowych.

Głównym celem prowadzonych badań było wyznaczenie metody pozwalającej na izolację spośród MSC oraz dalszą hodowlę poszukiwanej subpopulacji. Jako źródło MSC wybrano tkankę płodu – galaretkę Whartona (WJ-MSC), stromę sznura pępowinowego, która jest rozwojowo młodą tkanką, traktowaną jako odpad medyczny.

Na podstawie literatury zdecydowano się uwzględnić dwie techniki uzyskiwania poszukiwanej subpopulacji. Pierwszą z nich była zmiana warunków przestrzennych hodowli z 2D na 3D. Zdolność do wzrostu i proliferacji w warunkach przestrzenna (w sferach) charakteryzuje m.in. komórki pluripotencjalne. Drugą stosowaną techniką była izolacja subpopulacji metodą sortowania, w której wykorzystano marker powierzchniowy SSEA-4, wybrany po pierwszym etapie badań i występujący na powierzchni komórek pluripotencjalnych.

W pierwszym etapie badań, WJ-MSC, standardowo hodowane w warunkach adhezyjnych (2D), zostały przeniesione do warunków 3D, modyfikując metodę stosowaną w hodowli neuralnych komórek macierzystych (NSC) w postaci sfer. Hodowlę 3D prowadzono przez 20 dni w celu wyodrębnienia komórek o lepszej zdolności do przeżycia i proliferacji, które potencjalnie mogłyby wykazywać cechy komórek pluripotencjalnych. Długotrwała hodowla WJ-MSC w warunkach 3D okazała się czynnikiem stresogennym, prowadzącym do zwiększonej śmiertelności komórek, spowolnienia ich proliferacji, spadku zdolności do tworzenia kolonii oraz przyspieszenia procesów starzenia. Nie zauważono wzrostu ekspresji genów pluripotencjalnych, natomiast obserwowano wzrost ekspresji genów oraz markerów neuralnych. Jednocześnie stwierdzono, że w trakcie długotrwałej hodowli 3D znacząco lepszą przeżywalność wykazała subpopulacja WJ-MSC ekspresjonująca antygen powierzchniowy SSEA-4.

W oparciu o uzyskane wyniki, w drugim etapie prowadzonych badań zdecydowano się wyizolować i scharakteryzować WJ-MSC wykazujące ekspresję SSEA-4 jako potencjalną subpopulację komórek o szerszych zdolnościach do różnicowania. Poszukiwane komórki wyodrębniono z wykorzystaniem techniki sortowania komórek aktywowanego fluorescencyjnie (FACS). Otrzymana subpopulacja charakteryzowała się znacznie podwyższonym odsetkiem komórek SSEA-4+, który utrzymywał się przez 6 kolejnych pasażów hodowli komórkowej. Analiza subpopulacji SSEA-4+ wykazywała wyższą ekspresję genów pluripotencjalnych na początkowym etapie hodowli komórkowej w stosunku do populacji wyjściowej. Niestety, z czasem ekspresja tych genów spadła do poziomu obserwowanego w populacji niesortowanej. Przeanalizowano również właściwości funkcjonalne wyodrębnionej subpopulacji. Komórki SSEA-4+ przejawiały zdolność do tworzenia sfer, których średnica była mniejsza w stosunku do sfer utworzonych przez komórki populacji wyjściowej, a także zawierały znacząco więcej żywych komórek. Populacja SSEA-4+ nie różniła się zdolnością do różnicowania w kierunku trzech listków zarodkowych, tempem proliferacji oraz klonogennością od populacji niesortowanej oraz negatywnej (SSEA-4-). Zbadano również współwystępowanie SSEA-4 z innymi markerami kojarzonymi z właściwościami macierzystymi komórek, takimi jak: CD49F, CD133, CD146 czy CD271 - nie wykryto współzależności. Na podstawie otrzymanych wyników nie potwierdzono szerszego potencjału do różnicowania subpopulacji komórek SSEA-4+. Jednakże, otrzymana subpopulacja wyróżniała się odmiennym profilem sekrecyjnym w stosunku do populacji wyjściowej i populacji negatywnej, co może wskazywać na jej inne potencjalne wykorzystanie w medycynie regeneracyjnej.

Podsumowując, na podstawie zaproponowanych metod nie wyodrębniono subpopulacji komórek o cechach pluripotencjalnych. Otrzymane wyniki wskazują jednak na znaczną heterogenność morfologiczną i funkcjonalną populacji MSC. Wyodrębnianie poszczególnych grup komórek oraz szczegółowa analiza ich właściwości terapeutycznych wymagają dalszych badań.

## 2. Streszczenie angielskojęzyczne

Stem cells (SCs) are the basis of cellular therapies, widely used in regenerative medicine. Its main purpose is the replacement of injured cells by SCs provided with transplantation, that are capable to fully regenerate the tissue. The most desirable cells are pluripotent, i.e. those from which cells derived from all three embryonic germ layers can be derived, such as embryonic stem cells (ESCs) and induced pluripotent stem cells (iPSCs). However, observed wide differentiation potential is connected with limitless proliferation capacities and risks of tumorigenesis. Adult (somatic) SCs are proposed as an alternative, even though their narrow differentiation potential, usually limited to cells from one embryonic germ layer. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) are one of frequently studied adults SCs group, classified as multipotent, due to differentiability toward mesodermal cells i.e. osteocytes, chondrocytes and adipocytes. However, researchers reported the possibility of MSCs differentiating into cells derived from other germ layers, such as neurons (ectoderm) or hepatocytes (endoderm). Furthermore, under specific environmental conditions, MSCs exhibit the expression of pluripotency-related genes, but observed levels are still lower than reported for ESCs or iPSCs. Due to the high heterogeneity of MSCs population, there could be found cells with different differentiation potentials. It is proposed that those undifferentiated cells possess different developmental origin, i.e. originate from neural crest, what would explain their unique properties.

Hereby, this dissertation attempted a verification whether MSCs could contain subpopulation exhibiting pluripotent characteristics. Conducted experiments examined different factors for separation of cells possessing undifferentiated potential, that exhibit high proliferation and self-renewal potentials, elevated pluripotent genes expression (*SOX2*, *OCT3/4*, *NANOG*) and differentiate toward cells from all three embryonic germ layers.

The main purpose of described research was the development of efficient method to isolation and further cell culture of potential subpopulation exhibiting pluripotent features from MSCs. MSCs were isolated from Wharton Jelly (WJ-MSCs) – a part of umbilical cord which is a commonly used MSCs source.

Based on the recent literature, two potential methods for separation were chosen to derive the desired subpopulation. First approach was to change spatial condition of cell culture from 2D to 3D, associated with sphere-forming ability of pluripotent cells. Second approach was to isolate subpopulation expressing surface antigen SSEA-4, occurring in pluripotent cells.

During the first stage of doctoral research, WJ-MSCs, usually propagated in adherent 2D conditions, were transferred to 3D conditions, by modification of culture method proposed for neural stem cells. 3D culture was conducted for about 20 days *in vitro* to select cells with better survivability in harsh conditions; such cells could exhibit properties of pluripotent cells. However, long-term 3D culture was stressogenic for WJ-MSC, leading to slowed cell division ratio, reduced colony forming frequency and acceleration of senescence processes. Increase of pluripotent gene expression was not observed, while expression of markers connected with neural tissue was elevated. There was also reported that SSEA-4-positive cells exhibited better survival under long-termed 3D culture condition.

Based on received results, WJ-MSC positive for SSEA-4 were isolated and characterized as a theoretic population with a wider potential, during the second stage of doctoral research. This subpopulation was selected with fluorescence-activated cell sorting (FACS). Received positive population (WJ-MSC-SSEA-4+) contained significantly more SSEA-4+ cells for the next 6 passages of further in vitro culture. WJ-MSC-SSEA-+ population exhibited transient increase of pluripotent genes, that was reported directly after separation but diminished with further cell culturing. Other functional properties of isolated subpopulation were analyzed as well. WJ-MSC-SSEA-4+ cells formed spheroids upon 3D initiating conditions, that were smaller and contained more number of alive cells, compared to unsorted and negative populations (WJ-MSC-SSEA-4-). WJ-MSC-SSEA-4+ cells did not differed with tri-germ layer differentiatinal potential, proliferation and clonogenicity from initial and negative populations. SSEA-4 expression was not associated with other stemness markers such as CD49F, CD133, CD146 and CD271. According to the received results, SSEA-4+ population's pluripotent character was not confirmed. However, studied subpopulation could be applied for other therapeutic purposes due to their unique secretome profile.

In summary, presence of pluripotent-like subpopulation in WJ-MSC was not confirmed by chosen methods. However, observed results indicated a wide heterogeneity and diversity of subpopulations constituting to MSCs. Selection and detailed analysis of specific cell groups demand further research to relate their therapeutic applications.