

MARTYNA PODOBIŃSKA

Różnicowanie *in vitro* neuralnych komórek macierzystych
z ludzkiej krwi pępowinowej:
wpływ poziomu tlenu, związków niskocząsteczkowych
i geometrii przestrzennej mikrośrodowiska

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. n. med. Leonory Bużańskiej

Promotor pomocniczy – **dr Anna Sarnowska**

Pracownia Bioinżynierii Komórek Macierzystych
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego PAN



Warszawa 2017

STRESZCZENIE

W związku z szybkim rozwojem medycyny regeneracyjnej istnieje potrzeba zoptymalizowania zarówno metod otrzymywania, jak i prowadzenia hodowli komórek macierzystych do celów klinicznych. Takie komórki powinny zachować, pomimo hodowli *in vitro*, wysoki potencjał proliferacyjny, progenitorowy charakter, zdolność do ukierunkowanego różnicowania oraz stabilność genetyczną. Wymienione cechy charakteryzują komórki progenitorowe zasiedlające w organizmie nisze komórkowe. Odtworzenie w hodowli *in vitro* podobnych warunków daje nadzieję na stworzenie wystandaryzowanych procedur umożliwiających otrzymanie kompetentnych terapeutycznie komórek.

W naszej opinii do najważniejszych czynników warunkujących zachowanie progenitorowego charakteru komórek należą: stężenie tlenu panujące w docelowym narządzie, skład macierzy zewnątrzkomórkowej oraz struktura przestrzenna.

Celem przedstawionych w rozprawie badań była ocena wpływu ww. czynników na różnicowanie *in vitro* neuralnych komórek macierzystych otrzymanych z krwi pępowinowej (HUCB-NSC). W toku prowadzonych badań przeprowadzono analizę zarówno fenotypową jak i molekularną komórek poddanych różnym czynnikom środowiskowym takim jak: 1) zmienne stężenie tlenu, 2) obecność w środowisku czynników różnicujących oraz związków niskocząsteczkowych wpływających na status epigenetyczny i szlaki sygnałowe związane z proliferacją i różnicowaniem komórki 3) powierzchnie hodowlane 2D vs 3D o różnym składzie biochemicznym i geometrii.

Początkowo oceniono wpływ dwóch stężeń tlenu: 5% (typowego dla nisz komórek macierzystych w mózgu) oraz 21% (atmosferycznego) na różnicowanie i proliferację HUCB-NSC znajdujących się na różnych etapach rozwoju (komórki niezróżnicowane, wczesne progenitory vs komórki zróżnicowane w kierunku neuronalnym). Następnie podjęto próbę wyjaśnienia, czy obserwowana odpowiedź komórek związana jest z akumulacją czynników indukowanych hipoksją (HIF), wykorzystując do tego celu inhibitor hydroksylazy prolinowej – DMOG, prowadzący do akumulacji HIF1 α . W kolejnym etapie badań sprawdzano, czy stężenie tlenu w hodowli zmienia odpowiedź komórek na działanie inhibitorów szlaków sygnałowych (PD 0325901, SB 431542) i enzymów epigenetycznych (RG 108, TSA). W ostatnim etapie badań komórki zostały wysiane na powierzchnie 2D oraz różne pod względem składu i geometrii rusztowania 3D.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że obniżone (fizjologiczne) stężenie tlenu w hodowli stymuluje proliferację komórek, ale wpływ ten jest istotny na wczesnych etapach rozwoju - w przypadku tej pracy na etapie progenitorów neuralnych. W komórkach tych, hodowanych w warunkach 5% stężenia tlenu oraz w obecności inhibitora DMOG wykazaliśmy akumulację czynników HIF, przy zwiększonej ekspresji genu *NANOG* (genu pluripotencji) oraz wzroście tempa proliferacji komórek. Ponadto komórki te charakteryzowały się również zwiększonym potencjałem do różnicowania w kierunku neuronalnym (wyższa ekspresja *MAP2*), a także podwyższoną ekspresją genów kodujących enzymy epigenetyczne (*DNMT3A*, *DNMT3B*, *HDAC1*, *HDAC2*). Na podstawie powyższych wyników, do dalszych doświadczeń z wykorzystaniem związków niskocząsteczkowych i rusztowań trójwymiarowych wybrano komórki w stadium progenitorów neuralnych.

W kolejnych doświadczeniach wykazano, że badane związki niskocząsteczkowe (TSA, RG 108, PD 0325901, SB 431542) wpływają na ekspresję genów związanych z różnicowaniem HUCB-NSC, a zmiany te zależą od warunków tlenowych. Zaobserwowano, że stosując PD 0325901 lub SB 431542 w obecności 21% tlenu można uzyskać populację komórek charakteryzującą się wyższą ekspresją genów i białek typowych dla różnicowania neuronalnego. Odpowiednio, po zastosowaniu TSA w obecności 5% stężenia tlenu uzyskujemy heterogenną populację, wykazującą ekspresję genów i białek typowych dla neuronów i astrocytów, a po zastosowaniu SB 431542 otrzymujemy komórki ukierunkowane oligodendrocytarnie. Ponadto wykazano, że zastosowanie większości związków niskocząsteczkowych w obecności 5% stężenia tlenu obniża nieznacznie zdolność komórek do proliferacji.

Prowadzenie hodowli komórkowej w warunkach 3D utrzymuje komórki w stadium progenitorów neuralnych, a efekt ten jest wzmacniany w obecności 5% stężenia tlenu. Zdolności do przeżycia i różnicowania tych komórek w znacznym stopniu zależą od składu biochemicznego rusztowania i powierzchni adhezyjnej. Najkorzystniejsze wyniki uzyskano stosując rusztowania kolagenowe wzbogacone siarczanem chondroityny o dużych porach i znacznej powierzchni przylegania.

Podsumowując otrzymane wyniki, wydaje się, że sterując warunkami tlenowymi, składem biochemicznym środowiska (obecnością związków niskocząsteczkowych) oraz strukturą przestrzenną podłoża można wpływać na kierunek rozwoju komórek i w sposób kontrolowany przygotowywać je do zastosowania klinicznego.