

**WIOLETTA LECH**

Ocena właściwości neuroprotekcyjnych  
i regeneracyjnych komórek WJ-MSC w warunkach  
kontrolnych i modelach uszkodzenia OUN  
*in vitro, ex vivo i in vivo*

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych  
w dyscyplinie: biologia medyczna

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

Promotor pomocniczy – **dr n. med. Marzena Zychowicz**



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową  
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa 2022

## Streszczenie

Terapia komórkowa jest gałęzią medycyny regeneracyjnej i dotyczy przeszczepów komórek, w celu odbudowy uszkodzonej tkanki/narządu, kiedy leczenie farmakologiczne i chirurgiczne jest niewystarczające lub nieefektywne. Komórkami stosowanymi w przeszczepach terapeutycznych są zwykle komórki macierzyste, które posiadają potencjał do samoodnowy i wielokierunkowego różnicowania. Jedną z proponowanych eksperymentalnych metod terapii w przypadku uszkodzeń mózgu jest właśnie terapia komórkowa. Uszkodzenia mózgu, w tym udary, są szczególnym wyzwaniem dla medycyny regeneracyjnej ze względu na skomplikowaną i wielowymiarową specyfikę budowy Ośrodkowego Układu Nerwowego (OUN). W tej pracy wybrano udar mózgu jako model uszkodzenia OUN do badań nad kompetencją terapeutyczną komórek macierzystych, a szczególnie wpływu mikrośrodowiska i prekondycjonowania w fazie przygotowawczej do przeszczepu na ich właściwości proregeneracyjne.

Do badań wybrano Mezenchymalne Komórki Macierzyste (MSC) izolowane z galarety Whartona (WJ-MSC). MSC stanowią wyjątkowo obiecujące źródło komórek dla wykorzystania w medycynie regeneracyjnej ze względu na ich właściwości parakrynne oraz immunomodulacyjne, a także swoistą „plastyczność” rozwojową, co umożliwia różnicowanie w warunkach *in vitro* nie tylko w kierunku mezodermalnym, ale również ektodermalnym. Szczególnie dotyczy to komórek izolowanych z tkanek płodu, w tym WJ-MSC, z uwagi na ich wczesną dojrzałość rozwojową. Dodatkowo zaletą WJ-MSC jest brak ekspresji antygenów zgodności tkankowej klasy II (HLA-DR), co sprawia, że są uprzywilejowane immunologicznie i atrakcyjne dla zastosowań w medycynie regeneracyjnej w układzie allogenicznym.

Naturalne, endogenne mikrośrodowisko komórek macierzystych zwane „niszą” decyduje o ich przeżyciu i wzroście oraz umożliwia dalsze różnicowanie. Dlatego ważnym elementem tej pracy było określenie (zoptymalizowanie) biomimetycznego mikrośrodowiska *in vitro*, które będzie spełniało warunki podobne do endogennych: 1) kontrolnych – hodowla WJ-MSC w warunkach 3D w hydrożelu przypominającym składem i właściwościami mechanicznymi tkankę nerwową oraz w warunkach zawartości tlenu (5% O<sub>2</sub>) typowych dla niszy komórek macierzystych w mózgu; 2) patologicznych – dodatkowa stymulacja w warunkach jw. z czynnikami prozapalnymi. Wcześniejsze odpowiednie przygotowanie komórek macierzystych (tzw. prekondycjonowanie) może sprzyjać zwiększeniu potencjału terapeutycznego przeszczepionych komórek w leczeniu uszkodzeń, m.in. ośrodkowego

układu nerwowego. W szczególności pomoże ustalić, czy zastosowanie warunków imitujących naturalne mikrośrodowisko niszy komórkowej zwiększa działanie neuroprotekcyjne i immunomodulacyjne przeszczepianych komórek, stymulując tym samym proces endogennej regeneracji tkanki.

Z tego względu, głównym celem niniejszej pracy była ocena właściwości protekcyjnych i regeneracyjnych komórek WJ-MSC hodowanych w różnych warunkach mikrośrodowiska. Określono wpływ stężenia tlenu oraz hodowli trójwymiarowych (3D), stosując w tym celu hydrożelowe skafoldy – z lizatu płytkowego (LP) oraz fibrynogeny (FB).

Praca została podzielona na trzy etapy: badania *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* obejmujące ocenę porównawczą WJ-MSC hodowanych w warunkach 2D i 3D w 21% O<sub>2</sub> i 5% O<sub>2</sub>, przy czym hodowle w 5% stężeniu tlenu prowadzone były w systemie zamkniętym zapewniającym stałe warunki w trakcie hodowli i podczas wszelkich manipulacji z komórkami.

W badaniach *in vitro* przeprowadzono szczegółowe porównanie komórek WJ-MSC hodowanych w warunkach 2D i 3D w 21% O<sub>2</sub> lub 5% O<sub>2</sub> obejmujące m.in. analizę tempa proliferacji, przeżywalności, zdolności do różnicowania w kierunku neuralnym oraz zmiany ekspresji neurotrofin, cytokin pro- i przeciwzapalnych.

Badania *ex vivo* polegały na ocenie działania neuroprotekcyjnego komórek WJ-MSC hodowanych w różnych warunkach przestrzennych i tlenowych względem uszkodzonych w modelu OGD skrawków organotypowych hipokampa szczura, poprzez analizę przeżywalności komórek we wrażliwych na OGD strukturach hipokampa. Określono również profil odpowiedzi WJ-MSC na uszkodzoną tkankę nerwową.

Badania *in vivo* dotyczyły odpowiedzi organizmu biorcy na wykonany przeszczep komórek WJ-MSC w modelu udaru mózgu szczura, w zależności od sposobu ich podania (2D vs. 3D) oraz warunków hodowli komórek przed transplantacją (21% O<sub>2</sub> vs. 5% O<sub>2</sub>).

W pierwszym etapie badań wykazano, iż zastosowane skafoldy hydrożelowe tworzą strukturę umożliwiającą osadzenie się komórek, ich wysoką przeżywalność oraz migrację poza granice rusztowania. Komórki WJ-MSC zachowują również stabilne, liniowe tempo wzrostu w obu typach zastosowanych rusztowań, podobnie jak w standardowej hodowli 2D. Ponadto, w hodowlach 3D zaobserwowano istotne zmiany w ekspresji na poziomie mRNA badanych markerów (wzrost ekspresji *BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*, *TGF-β1*, *IL-6*, *IL-1β*) po 24 godz., utrzymujące się również w trakcie kilkudniowej hodowli *in vitro* w porównaniu z hodowlą kontrolną 2D, zarówno w warunkach 21% jak i 5% stężenia tlenu. Dodatkowo, w komórkach hodowanych w skafoldach zaobserwowano zwiększoną ekspresję markerów neuralnych (nestyny, β-Tubuliny III, NF-200 i GFAP) na poziomie mRNA oraz

białka. Zastosowanie czynników prozapalnych w hodowli *in vitro* miało na celu sprawdzenie odpowiedzi WJ-MSC na warunki mikrośrodowiska zapalnego, jakie występuje w uszkodzonej tkance. W wyniku stymulacji komórek WJ-MSC zaobserwowano, że warunki hodowli 3D wyraźnie zwiększyły odpowiedź komórek WJ-MSC na zastosowanie czynników prozapalnych, co skutkowało zwiększoną ekspresją na poziomie mRNA zarówno czynników troficznych (*BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*), jak i immunomodulacyjnych (*TGF-β1*, *IL-6*, *IL-1β*) w porównaniu do hodowli 2D.

W badaniach *ex vivo* wykorzystano model OGD, polegający na czasowym pozbawieniu tkanki tlenu i glukozy, co imituje uszkodzenie ischemiczne. Po przeprowadzonej współhodowli uszkodzonych skrawków organotypowych hipokampa szczura z komórkami WJ-MSC zaobserwowano, że WJ-MSC hodowane zarówno w warunkach 21% jak i 5% stężenia tlenu wykazują silne działanie neuroprotektoryjne. Najsilniejszy efekt zahamowania śmierci neuronów wrażliwych na niedotlenienie zaobserwowano podczas współhodowli z komórkami z 5% tlenu zasiedlającymi skafold fibrynowy. Co ciekawe, w komórkach WJ-MSC zawieszonych w skafoldach i współhodowanych z uszkodzonymi skrawkami hipokampa zaobserwowano również wzrost ekspresji czynników troficznych, m.in. *GDNF*, *VEGF-A* oraz spadek ekspresji cytokin prozapalnych, m.in. *IL-1β*, przy jednoczesnym wzroście ekspresji cytokiny przeciwzapalnej, tj. *TGF-β1*.

Badania *in vitro* oraz *ex vivo* wykazały, iż warunki przestrzenne hodowli 3D oraz 5% O<sub>2</sub> zwiększają działanie neuroprotektoryjne komórek WJ-MSC i mogą wpływać na ich potencjalne właściwości regeneracyjne. Z tego powodu dalsze badania *in vivo* opierały się na ocenie modulacji reakcji zapalnej oraz procesu regeneracji uszkodzonej tkanki z wykorzystaniem eksperymentalnego modelu cytotoksycznego uszkodzenia mózgu szczura. Analiza obejmowała ocenę zdolności komórek do przeżycia i migracji w różnym czasie od ich podania poprzez wykonanie obrazowania mózgu metodą rezonansu magnetycznego. Określono również wpływ przeszczepionych komórek na wielkość powstałego uszkodzenia mózgu, a także przeprowadzono szczegółową ocenę poziomu ekspresji neurotrofin, cytokin pro- i przeciwzapalnych w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz na poziomie mRNA w uszkodzonym mózgu szczura.

Sygnal pochodzący z wyznakowanych nanocząstkami tlenku żelaza komórek WJ-MSC zaobserwowano w miejscu podania (prążkowie) po 24 godz. od transplantacji do mózgu, a także w kolejnych punktach czasowych – 7, 14, 21 dni od przeszczepu. Nie zaobserwowano migracji komórek do innych struktur mózgu, poza prążkowie, które uległo uszkodzeniu. Dodatkowo, po podaniu komórek w 2D oraz skafoldach zaobserwowano

wyraźny sygnał w miejscu lezji podczas obrazowania zależnego od dyfuzji (DWI), którego nie odnotowano w wyniku podania sham, ani w następstwie samego uszkodzenia ogniskowego. Po uszkodzeniu wywołanym ouabainą w porównaniu do kontroli zaobserwowano wzrost ekspresji badanych markerów: *BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*, *TGF-β1*, *IL-6* oraz *IL-1β*, szczególnie po 24 godz. od urazu.

W wyniku podania komórek WJ-MSC zaobserwowano zmniejszenie wielkości uszkodzenia mózgu indukowanego iniekcją ouabainy oraz wzrost ekspresji sznurzych markerów: *BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*, *TGF-β1* w porównaniu do poziomu ekspresji obserwowanego w uszkodzonym prążkowie. Najwyższy wzrost ekspresji analizowanych genów stwierdzono w przypadku podania komórek, które były hodowane w 5% O<sub>2</sub>, a następnie przeszczepione w hydrożelowych skafoldach. Podanie komórek WJ-MSC skutkowało również spadkiem ekspresji sznurzych *IL-6* oraz *IL-1β*, szczególnie po 24 godz. od przeszczepu. Badania te umożliwiły określenie dynamiki zmian, występujących w uszkodzonym mózgu szczura po podaniu materiału terapeutycznego w postaci komórek WJ-MSC prekondukcjonowanych w określonych warunkach mikrośrodowiska. Otrzymane wyniki wykazały, że hydrożelowe rusztowania wykonane z lizatu płytkowego i fibrynogenu zastosowane w niniejszej pracy stanowią obiecujący materiał dla potencjalnego wykorzystania w terapii komórkowej chorób układu nerwowego. Uzyskane wyniki sugerują, że najbardziej korzystnie terapeutycznie wydaje się być utrzymywanie komórek w hodowli w warunkach fizjologicznej normoksji (5% O<sub>2</sub>), a następnie ich przeszczepienie z wykorzystaniem hydrożelowych rusztowań o właściwościach mechanicznych podobnych do tkanki typowej dla mózgu, które jednocześnie będą chroniły komórki przed reakcją układu odpornościowego biorcy.

Opracowanie skutecznych, efektywnych, powtarzalnych i przede wszystkim bezpiecznych metod pozyskiwania, namnażania i przeszczepiania komórek macierzystych zwiększa szanse na skuteczne wykorzystywanie terapii komórkowej w medycynie regeneracyjnej. W przypadku terapii komórkowej chorób OUN na dzień dzisiejszy brak jest doniesień o pełnej regeneracji uszkodzonej tkanki wraz z odbudową funkcjonalnych obwodów nerwowych. Pozytywny efekt terapeutyczny w prowadzonych próbach klinicznych dotyczy głównie właściwości parakrynych (wydzielniczych) podawanych komórek, a nie na ich zdolności do różnicowania i funkcjonalnej integracji z uszkodzoną tkanką. Przeszczepione komórki poprzez wydzielanie do otaczającego środowiska licznych czynników wzrostowych (m.in. angio- i neurogennych) oraz cytokin przeciwzapalnych, mogą stymulować endogenne komórki i przez to wpływać na remodelowanie tkanki oraz zwiększać podatność układu

nerwowego na rehabilitację. Dlatego otrzymane w tej pracy wyniki, które kompleksowo określają i optymalizują warunki prekondycjonowania WJ-MSC w hodowli *in vitro* oraz sposób ich podania w eksperymencie przedklinicznym *in vivo* są cenne dla rozwoju medycyny regeneracyjnej z wykorzystaniem terapii komórkowej.