

Katarzyna Stefańska

## **Opracowanie metody izolacji i hodowli pierwotnej oraz badanie zdolności do różnicowania się komórek macierzystych pozyskiwanych z galarety Whartona**

### **Streszczenie**

Galareta Whartona to rodzaj tkanki łącznej zawartej w sznurze pępowinowym, a jej główną rolą jest ochrona pępowinowych naczyń krwionośnych przed zaginaniem. Komórki w niej zawarte wykazują cechy mezenchymalnych komórek macierzystych (ang. *mesenchymal stem cells*, MSCs), tzn. wykazują adhezję do plastikowych powierzchni naczyń hodowlanych, posiadają zdolność różnicowania się do chondrocytów, adipocytów i osteoblastów, a na ich powierzchni ekspresji ulegają specyficzne antygeny, m.in. CD73, CD90 i CD105, przy jednoczesnym braku ekspresji antygenów typowych dla linii hematopoetycznych i endotelialnych: CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79α, CD19 and HLA-DR. Dodatkowo, mezenchymalne komórki galarety Whartona (ang. *Wharton's jelly mesenchymal stem cells*, WJ-MSCs) wykazują szerokie właściwości immunomodulujące, a ich pozyskanie nie wiąże się z przeprowadzeniem dodatkowego zabiegu, gdyż stanowią odpad medyczny. W związku z powyższym ich wykorzystanie w terapiach komórkowych wydaje się obiecujące. Jednakże potrzebne są dalsze badania, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, aby dokładniej poznać mechanizm działania WJ-MSCs oraz możliwe skutki uboczne takich terapii.

Przedmiotem badań zrealizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej była analiza transkryptomyczna komórek WJ-MSCs nieodróżnicowanych oraz zróżnicowanych do chondrocytów, adipocytów, osteoblastów i komórek typu nerwowego. Założono, że zoptymalizowana metoda izolacji, długoterminowej hodowli pierwotnej oraz różnicowania komórek WJ-MSCs pozwoli na uzyskanie odpowiednich populacji wymienionych rodzajów komórek docelowych, oraz że analiza transkryptomyczna tych komórek dostarczy nowych informacji odnośnie molekularnych mechanizmów zaangażowanych w proces różnicowania *in vitro*, co powinno umożliwić ich zastosowanie w środowisku klinicznym.

Komórki WJ-MSCs wyizolowano metodą enzymatyczną ze sznurów pępowinowych pozyskanych przy okazji donoszonych porodów od zdrowych pacjentek. Następnie komórki hodowano w standardowych warunkach *in vitro* oraz poddano charakterystyce z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, aby potwierdzić ich tożsamość i określić obecność wybranych antygenów powierzchniowych (CD90, CD105, CD73, CD44) oraz brak obecności antygenów linii hematopoetycznych i endotelialnych (CD31, CD34). Następnie komórki zróżnicowano do osteoblastów, chondrocytów, adipocytów i komórek typu nerwowego, co potwierdzono specyficznym barwieniem (Alizarin Red dla osteoblastów, Alcian Blue dla chondrocytów, Oil Red dla adipocytów, fiolet krezyłu dla komórek typu nerwowego). Zarówno ze zróżnicowanych, jak i nieodróżnicowanych (kontrolnych) komórek wyizolowano RNA i poddano je sekwencjonowaniu. Na podstawie analizy bioinformatycznej i statystycznej zidentyfikowano geny o zmienionej ekspresji w komórkach zróżnicowanych w porównaniu z kontrolą.

Uzyskane wyniki wskazują, że WJ-MSCs różnicowane do osteoblastów i adipocytów wykazują wiele podobieństw w zakresie genów o podwyższonej ekspresji, podczas gdy WJ-MSC indukowane do komórek typu nerwowego różnią się znacznie w tej kwestii od pozostałych trzech grup. Większość zidentyfikowanych genów o zróżnicowanej ekspresji została już wcześniej powiązana z procesem różnicowania MSCs (np. *IL1RL1* i *RORB* dla różnicowania osteogennego, *DLK1* dla różnicowania adipogennego, *DPT* dla różnicowania chondrogennego lub *DTX1* i *ZBTB16* dla różnicowania neurogennego), chociaż w większości przypadków wyniki te uzyskano z eksperymentów przeprowadzonych na modelach zwierzęcych. Dodatkowo analiza genów o zróżnicowanej ekspresji związanych tylko z procesem apoptozy wykazała, że większość genów ulegających podwyższonej ekspresji w zróżnicowanych WJ-MSCs należy do grupy ontologicznej „*positive regulation of apoptotic proces*”, dlatego należy rozważyć, czy przedłużona hodowla *in vitro* i różnicowanie przed zastosowaniem klinicznym jest zasadne. Należy wziąć pod uwagę fakt, że MSCs stosowane *in vivo* mogą być narażone na śmierć komórkową ze względu na hipoksję i niedostateczną zawartość składników odżywczych w środowisku.

Przedstawione wyniki dają wgląd w zmiany transkryptomiczne zachodzące podczas różnicowania WJ-MSCs *in vitro* i umożliwiają identyfikację nowych markerów zaangażowanych w ten proces, co może służyć jako punkt odniesienia dla przyszłych badań. Chociaż opracowanie bezpiecznych i skutecznych terapii komórkowych wymaga dalszych analiz proteomicznych, identyfikacja genów o zróżnicowanej ekspresji zaangażowanych w proces różnicowania *in vitro* umożliwi dokładniejsze zrozumienie fizjologii WJ-MSC.

28.09.2023 K. Stefańska