

STRESZCZENIE:

Mezenchymalne komórki macierzyste (ang. Mesenchymal Stem Cell, MSC) charakteryzuje wysoki potencjał regeneracyjny i immunomodulujący, a możliwość ich pozyskania z tkanek dorosłego organizmu i dogłębne poznanie ich właściwości biologicznych ciągle stanowi przedmiot badań wielu naukowców.

Głównym celem badań prowadzonych w niniejszej pracy była charakterystyka biologiczna *in vitro* ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych zlokalizowanych w czterech niszach tkankowych organizmu człowieka: w szpiku kostnym (BM-MSC), tkance tłuszczowej (AT-MSC), mięśni szkieletowym (SM-MSC) oraz skórze (SK-MSC). Materiałem, którym posłużono się w niniejszej pracy, był szpik kostny pozyskany od zmarłych w czasie autopsji, mięsień szkieletowy oraz tkanka tłuszczowa, pozyskane w formie pozostałości po zabiegach chirurgicznych oraz skóra pozyskana po zabiegu amputacji kończyn dolnych.

Zbadano podobieństwa i różnice w ekspresji markerów charakterystycznych (CD73, CD90, CD105) oraz negatywnych (CD34, CD45) dla komórek MSC, a także ekspresję markerów związanych z regulacją procesu angiogenezy (PDGFR α , CD146) oraz tych świadczących o macierzystym i/lub progenitorowym charakterze badanych komórek (PW1, CD56). Wzięto pod uwagę również poziom ekspresji genów: *Sox2* i *Oct4*, będących wskaźnikami stopnia nieodróżnicowania komórek, genu supresorowego *p53*, oraz protoonkogenego *c-Myc*. Cechami funkcjonalnymi komórek MSC, którym poświęcono szczególną uwagę była zdolność do wydzielania cytokin do pożywki pochodowlanej, zdolności komórek do różnicowania w stronę osteoblastów, adipocytów i chondrocytów oraz zdolności do tworzenia spontanicznych fuzji. W badaniach wykorzystano metody: cytometrii przepływowej, barwień immunocytochemicznych, real time RT-PCR oraz Multiplex ELISA. Oprócz charakterystyki różnic pomiędzy MSC zależnie od tkanki, z której pochodzą, uwagę poświęcono temu jak na biologię komórek wpływa długoterminowa hodowla *in vitro*. W celu dokładnego zobrazowania zjawiska zmian fenotypowych dokonano analizy dynamiki intensywności fluorescencji poszczególnych markerów, co odpowiada zagęszczeniu badanych antygenów w komórce. Obserwacje prowadzono do pasaży P9 - P10.

Zaobserwowano, że komórki o podstawowym fenotypie komórek MSC można wyizolować z każdej z badanych tkanek. Już w pasażu P1 hodowle charakteryzowały się wysoką czystością, biorąc pod uwagę wysoką (>90%) ekspresję markerów CD73, CD90 oraz

CD105, oraz niską (<3%) ekspresję markerów CD34 oraz CD45. Od tej reguły odbiegały komórki izolowane z mięśnia szkieletowego, które w pasażu P1, posiadały niższy udział populacji komórek CD105+ (78%). Populacja komórek izolowanych z mięśnia szkieletowego charakteryzowała się heterogennością, o czym świadczy ekspresja antygenu CD56, będącego markerem m.in. komórek progenitorowych. Cechą typową dla SM-MSC był również brak zdolności do różnicowania adipogennego, co świadczy o ich bipotencjalnym charakterze. Komórki izolowane z mięśnia przy stosowanej metodologii miały charakter raczej progenitorowy niż multipotencjalny. Komórki BM-MSC charakteryzowały się największą stabilnością podstawowego fenotypu komórki MSC oraz najdłużej trwającą ekspresją markera CD146 (do P10), który w przypadku MSC izolowanych z innych tkanek szybko zanikał (pomiędzy P5 i P6). BM- oraz AT-MSC, w przeciwieństwie do SM- oraz SK-MSC były zdolne do wydzielania dużych stężeń różnorodnych cytokin i czynników troficznych do pożywki pochodowlanej. Najbardziej charakterystycznymi były MCP-1, IL-8, VEGF oraz IL-6, której najwyższe stężenie obserwowane było po hodowli AT-MSC.

Nowym spojrzeniem na biologię MSC było badanie obecności białka PW1 dotąd identyfikowanego w populacji komórek progenitorowych mięśni szkieletowych. Ekspresja tego białka była obserwowana w komórkach MSC izolowanych z badanych tkanek oprócz BM-MSC. PW1 opisywany był przez wiele lat jako białko będące mediatorem apoptozy. Późniejsze doniesienia charakteryzowały PW1 jako marker związany z miogenezą. W niniejszej pracy zaobserwowano, że komórki SM-MSC o silnej ekspresji CD56, wchodzące ze sobą w fuzje, charakteryzowały się również wyjątkowo silną, cytoplazmatyczną ekspresją PW1. Najnowsze z kolei doniesienia sugerują, że PW1 może być kolejnym markerem komórek macierzystych. Interesujący jest jednak fakt braku jego ekspresji wśród komórek BM-MSC we wczesnych pasażach, które uznaje się za najmniej zróżnicowany typ komórek MSC.

Badane MSC, zależnie od tkanki, z której były izolowane, charakteryzowały się różnicami w ekspresji genów związanych z pluripotencjalnymi właściwościami komórek. Najwyższą ekspresją genu *Sox2* w P1, w porównaniu do kontroli iPSC, charakteryzowały się komórki SK-MSC. Ekspresja mRNA dla *Sox2* w pasażu P1 była niska w komórkach BM-MSC, ale rosła wraz z liczbą pasaży. Obserwowana ekspresja w komórkach AT- oraz SM-MSC była raczej stabilna pomiędzy pasażami. Ekspresja *Oct4* w komórkach BM- oraz AT-MSC wzrastała wraz ze wzrostem liczby pasaży, natomiast w SK-MSC była stabilna, w SM-MSC charakteryzowała się nagłym spadkiem ekspresji w P5, co wiązać się mogło z procesami spontanicznej miogenezы. W związku z miogenezą w P5 w komórkach SM-MSC

zaobserwowano również spadek ekspresji czynnika p53, który w MSC z innych tkanek charakteryzował się stabilnością. Najwyższa ekspresja c-Myc w porównaniu do kontroli iPSC obserwowana była w komórkach AT-MSC. Obserwacja ta sugeruje konieczność poświęcenia szczególnej uwagi komórkom AT-MSC, jeśli rozważane jest ich zastosowanie kliniczne. Wysoka ekspresja c-Myc może wiązać się z wyjątkowym potencjałem proliferacyjnym, ale nie można w tym wypadku wykluczyć zwiększonego ryzyka powstawania guzów nowotworowych.

BM-MSC oraz AT-MSC charakteryzują się szczególnym potencjałem do wchodzenia w fuzje z SM-MSC. Podobnej aktywności nie zaobserwowano w aranżacji z SK-MSC. Obserwacje te sugerują, że mimo podobieństw w podstawowym fenotypie między BM-, AT- i SK- MSC, istnieją funkcjonalne różnice biologiczne, determinowane przez czynniki, których mechanizmy działania nie są jeszcze do końca poznane. Niemniej jednak fakt, że AT-MSC wchodzą w fuzje równie efektywnie jak BM-MSC sugeruje kolejne podobieństwo między tymi dwoma źródłami komórek MSC i alternatywę dla cechujących się ograniczeniami w dostępności BM-MSC.

Uzyskane wyniki są udokumentowaniem różnic biologicznych w potencjale MSC pozyskanych z różnych tkanek, które mogą być znaczące z punktu widzenia ich zastosowania w medycynie regeneracyjnej i rozszerzają wizję celowanych terapii, w których komórki MSC dobierane będą pod kątem ich potencjału regeneracyjnego i stabilności genetycznej.