

## Ocena wpływu czynnika indukowanego hipoksją 1 na immunomodulacyjne właściwości ludzkich mezenchymalnych komórek zrębu

Mezenchymalne komórki zrębu, zwane też mezenchymalnymi komórkami macierzystymi (MSC), to komórki występujące w różnych tkankach ludzi i wielu gatunków zwierząt. Można je z powodzeniem izolować z fragmentów pobranej tkanki i namnażać w laboratorium. MSC potrafią różnicować się w kilka typów komórek, a także wydzielają czynniki pobudzające procesy regeneracyjne. Ponadto, wpływają na aktywność komórek układu odpornościowego, co jest nazywane immunomodulacją. Układ immunologiczny jest konieczny do obrony naszych organizmów przed patogenami, ale ma też swoje ciemne strony - np. jest odpowiedzialny za odrzucanie przeszczepów i rozwój chorób związanych z tzw. autoagresją. Najważniejszą grupą komórek odpowiedzialną za te niekorzystne oddziaływania układu immunologicznego są limfocyty. Wiadomo, że populacja MSC w warunkach *in vitro* bardzo silnie hamuje podziały aktywowanych limfocytów, jednocześnie zwiększając w nich udział limfocytów T regulatorowych, subpopulacji, która wywołuje tolerancję immunologiczną i hamuje nasilone procesy zapalne. Dlatego, transplantacje komórek MSC próbuje się wykorzystywać w terapii chorób autoagresywnych lub jako wspomaganie przeszczepień narządowych. W ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się na wpływ czynników fizycznych na procesy zachodzące w naszych organizmach. Jednym z takich czynników jest stężenie parcjalne tlenu. Większość doświadczeń *in vitro* prowadzi się w warunkach atmosferycznych, gdzie zawartość tlenu stanowi ok. 21%. W tkankach naszego organizmu ciśnienie parcjalne tlenu jest znacznie niższe i wynosi zwykle ok. 5-10%, a w strukturach patologicznych, jak środek guza nowotworowego, czy niedokrwiona tkanka, nawet 1%. Wiadomo, że warunki niedotlenienia wpływają lokalnie na profil odpowiedzi immunologicznej. Z drugiej strony wiadomo, że obniżona zawartość tlenu wpływa na aktywność komórek MSC. Nadrzędnym czynnikiem, który jest odpowiedzialny za adaptację komórek do warunków niedoboru tlenu, jest białko HIF-1. Co ciekawe, znaczenie aktywacji HIF-1 dla interakcji pomiędzy komórkami immunologicznymi a MSC nie zostało dotychczas szczegółowo zbadane. Dlatego celem niniejszego projektu jest określenie wpływu działania czynnika HIF-1 na właściwości immunomodulacyjne komórek MSC. Dodatkowo planowane jest porównanie oddziaływania HIF-1 w omawianym zakresie na MSC wyizolowane z różnych źródeł.

Doświadczenia będą przeprowadzane z użyciem ludzkich MSC izolowanych z dwóch źródeł - szpiku kostnego (dorosłe MSC) i sznura pępowinowego (okołoporodowe MSC). Ze względu na wybitną niestabilność biologiczną podjednostki  $\alpha$  czynnika HIF-1 jego aktywacja będzie wywoływana na 3 różne sposoby: 1) poddanie komórek MSC warunkom niedotlenienia w inkubatorze; 2) poddanie komórek MSC działaniu chemicznego stabilizatora HIF-1 $\alpha$ ; 3) za pomocą wprowadzenia do komórek MSC genu kodującego stabilną formę HIF-1 $\alpha$ . Po wywołaniu aktywacji HIF-1 komórki będą analizowane w porównaniu do komórek kontrolnych, czyli niepoddanych żadnym manipulacjom. Zostaną przeprowadzone szczegółowe badania, jak dane traktowanie zmieniło w komórkach MSC ekspresję genów, białek i tego, co wydzielają do środowiska pozakomórkowego. Następnie, w warunkach *in vitro* będą prowadzone współhodowle MSC z komórkami układu odpornościowego (limfocytami i makrofagami). Celem tej części projektu będzie określenie, jak aktywacja HIF-1 w MSC wpływa na opisane interakcje. Kompleksowa analiza uzyskanych danych z użyciem metod bioinformatycznych pozwoli na wytypowanie prawdopodobnych mechanizmów odpowiedzialnych za obserwowane zmiany. Wypracowane hipotezy robocze będą weryfikowane w kolejnym, czwartym etapie projektu, poprzez stosowanie specyficznych blokerów określonego czynnika (procesu) i powtórne przeprowadzenie danej serii doświadczeń. Wybrane eksperymenty będą dodatkowo równolegle przeprowadzone z użyciem komórek izolowanych ze sznura pępowinowego, co pozwoli na określenie znaczenia pochodzenia MSC na obserwowane procesy.

Właściwości immunomodulacyjne komórek MSC budzą ogromne nadzieje. Jednakże, wyniki dotychczasowych prób klinicznych nie są tak obiecujące jak rezultaty badań *in vitro*. Określenie wpływu aktywacji HIF-1 w MSC dla ich właściwości immunomodulacyjnych w założeniu ma pozwolić na lepsze zrozumienie mechanizmów fizjologicznego i terapeutycznego oddziaływania MSC. Spodziewamy się, że określenie wpływu niedotlenienia na interakcje pomiędzy MSC a komórkami zapalnymi przybliży wyjaśnienie różnic w efektywności stosowania MSC w różnych stanach chorobowych. Uzyskane wyniki mogą również stanowić podstawę do określania nowych strategii wzmacniania potencjału immunomodulacyjnego MSC.