

Jednym z trudniejszych wyzwań współczesnej medycyny jest otrzymanie czynnych terapeutycznie komórek macierzystych, optymalnie dobranych do konkretnego schorzenia zarówno pod względem zdolności ich do różnicowania i odbudowy tkanki, jak i utrzymania dłuższego, ale określonego potencjału do proliferacji. Jak wykazują liczne badania, można to uzyskać, a nawet wzmocnić, poprzez prawidłowy dobór rodzaju komórek oraz różnorodne modyfikacje warunków ich hodowli *in vitro* (tzw. *prelicensing*). Rozwój terapii komórkowej prowadzonej głównie w oparciu o mezenchymalne komórki macierzyste/stromalne (MSC) potwierdził silne właściwości wydzielnicze i immunomodulacyjne tychże komórek, ale ich działanie regeneracyjne (odtworzenie tkanki) zostało potwierdzone jedynie w nielicznych gałęziach medycyny t.j. ortopedia, dermatologia, czy okulistyka. Populację komórek o wysokim potencjale do dojrzałego różnicowania w określoną tkankę, w tym np. nerwową stanowią płodowe komórki macierzyste np. płodowe komórki neuralne (fNSC; fetal neural stem cells). Niestety ich przeżycie i proliferacja po przeszczepie są znacznie ograniczone ze względu na brak odpowiedniej stymulacji czynnikami wzrostu oraz silny lokalny proces zapalny wywołany transplantacją allogeniczną. W tym kontekście ważne wydaje się wykorzystanie unikalnych właściwości WJ-MSC, których działanie immunomodulujące zostało potwierdzone stosując je jako drugą linię leczenia w chorobie przeszczep przeciw gospodarzowi (GvHD). Kolejnym ważnym kryterium umożliwiającym wykorzystanie obu wymienionych rodzajów komórek w przyszłej terapii klinicznej jest ich podobne, post-embryonalne stadium rozwojowe, dzięki czemu należy sądzić, że przeszły już one rozwojową barierę niestabilności genetycznej i związanej z tym tumorogenności rozwojowej.

Celem projektu jest zbadanie wzajemnych oddziaływań obu wyżej wymienionych rodzajów komórek terapeutycznych pod kątem ich udziału w odbudowie uszkodzonej tkanki nerwowej. Przewidujemy synergiczne korzyści polegające na bezpośrednim i pośrednim oddziaływaniu MSC / fNSC na ekspansję i różnicowanie zarówno w hodowli komórkowej *in vitro*, jak i w eksperymentalnych modelach uszkodzonego mózgu szczura *in vivo*. Dominujące mechanizmy tych interakcji komórkowych będą analizowane w projekcie, zwłaszcza w aspekcie określenia najbardziej fizjologicznego środowiska (niszy) sprzyjającego różnicowaniu i wbudowywaniu się fNSC do uszkodzonego mózgu.

W trakcie projektu planujemy przeprowadzić badania zgodnie z wytycznymi FDA, rozpoczynając współhodowlę WJ-MSC/fNSC od doświadczeń *in vitro* badających pośrednie interakcje z zastosowaniem insertów umożliwiających przestrzennie oddzieloną hodowlę dwóch typów komórek. Taki model doświadczeń umożliwi lepszą analizę czynników rozpuszczalnych (parakrynych) wpływających na różnicowanie i migrację NSC oraz zmiany ekspresji genów zachodzące w trakcie różnicowania. W celu poznania interakcji bezpośrednich (cell-cell) założone zostaną hodowle mieszanych neurosfer, składających się z WJ-MSC oraz fNSC. Będą one stanowiły zarówno przestrzenny jak i składnikowy model niszy komórkowej.

Celem kolejnego etapu projektu będzie ocena zdolności do migracji i integracji fNSC transplantowanych na uszkodzoną tkankę nerwową w obecności współhodowanych WJ-MSC. W tych doświadczeniach wykorzystana zostanie organotypowa hodowla skrawków hipokampa szczura (OHC). Model ten pozbawiony jest odpowiedzi humoralnej, często stanowiącej zaporę dla przeszczepów xenogenicznych, przy jednoczesnym zachowaniu cytoarchitektury i waskulatury prawidłowej tkanki oraz naturalnych włókien projekcyjnych stanowiących drogi migracji dla nowopowstałych progenitorów neuralnych. W celu odtworzenia *in vitro* uszkodzenia do którego dochodzi w wyniku niedokrwienia mózgu, skrawki zostaną pozbawione czasowo tlenu i glukozy (OGD). Transplantowane na skrawki fNSC będą poddane stymulacji czynnikami wzrostu i cytokinami przeciwzapalnymi wydzielanymi przez współhodowane pod membranę WJ-MSC. W tym etapie ocenione zostaną: szlaki migracji fNSC w zależności od miejsca transplantacji (rejon DG vs CA), dynamika migracji w zależności od czasu tx po uszkodzeniu (wczesna pourazowa vs późna) oraz wbudowanie tx komórek fNSC w cytoarchitekturę hipokampa.

Obserwacje w takim modelu są jednak ograniczone ze względu na stosunkowo krótki czas hodowli skrawków (maksymalnie 2-3 tygodnie). Jedynym modelem umożliwiającym długotrwałą obserwację przeszczepionych komórek pozostaje model zwierzęcy. W tym celu zostaną przeprowadzone badania w eksperymentalnym modelu cytotoksycznego uszkodzenia mózgu u szczurów (Domańska-Janik i wsp. 2008, Kozłowska i in., 2007). Komórki fNSC będą podawane domózgowo w pobliżu miejsca uszkodzenia (kora mózgu i prążkowie), natomiast WJ-MSC zostaną podane do płynu mózgowo-rdzeniowego.

Mamy nadzieję, że dzięki właściwościom sekrecyjnym WJ-MSC będziemy mogli zaobserwować zwiększone właściwości regeneracyjne fNSC, ich wydłużone przeżycie, a także ukierunkowaną migrację do miejsc uszkodzonych mózgu, ich zasiedlenie oraz częściową regenerację tkanki.