

Udar niedokrwienny mózgu jest drugą po chorobach układu krążenia najczęstszą przyczyną śmierci, zaskakująco bardziej rozpowszechnioną niż choroby nowotworowe. Niemniej na chwilę obecną jedyną powszechnie stosowaną metodą jego leczenia jest tromboliza z zastosowaniem rekombinowanego aktywatora plazminogenu (rtPA). Metoda ta jednak wymaga podania leku w przeciągu 4,5 godzin po wystąpieniu udaru co znacząco ogranicza jej skuteczność i powoduje, że wielu pacjentów, którzy przeżywają cierpi na szereg dysfunkcji będących skutkami przebytego udaru. Stąd też istnieje pilna potrzeba znalezienia terapii, które niwelują negatywne skutki choroby u pacjentów, którzy przeżyli udar.

Mezenchymalne komórki stromalne pochodzące z tkanek takich jak szpik kostny, galareta Whartona czy miazga zęba, są grupą komórek intensywnie badanych pod kątem ich zastosowania w regeneracji uszkodzonej tkanki nerwowej. Wśród nich populacją o największym potencjale do wspierania odbudowy tkanki nerwowej są komórki pochodzące z miazgi zęba (ang. dental pulp stromal cells – DPSCs). Jest to spowodowane faktem, iż miazga w toku rozwoju embrionalnego powstaje z komórek progenitorowych grzebienia nerwowego, a więc z ektodermy czyli listka zarodkowego, z którego rozwijają się neurony i komórki głejowe. O ile strategii regeneracyjne bazujące na różnicowaniu komórek DPSCs w neurony wymagają jeszcze wielu badań, potwierdzono iż komórki te mogą pobudzać endogenne mechanizmy regeneracyjne uszkodzonych tkanek na drodze parakrynej. Wśród tych efektów istotną rolę pełni nie tylko działanie pobudzające docelowe komórki do proliferacji i różnicowania, ale także potencjał tych komórek do immunomodulacji. Jak wiadomo w toku udaru oraz chorób neurodegeneracyjnych chroniczny stan zapalny w ognisku choroby prowadzi do poważnych uszkodzeń. Ponieważ jednym z postulowanych mechanizmów parakrynnego działania komórek DPSCs jest ich oddziaływanie na komórki docelowe poprzez aktywność zarówno własnych chemokin jak i modulację sekrecji chemokin przez te komórki, celem projektu będzie zbadanie tej drogi parakrynnego oddziaływania DPSCs. **Hipoteza projektu zakłada, że regeneracyjne właściwości komórek DPSCs zależą od aktywności chemokin CXCL12, CCL2 oraz CX3CL1, a modulacja ich aktywności biologicznej poprzez zastosowanie antagonistów ich receptorów wpłynie na neuroprotektoryjne działanie DPSCs na organotypowe hodowle hipokampa (ang. organotypic hippocampal cultures – OHC) poddane eksperymentalnemu modelowi niedokrwienia.** CXCL12 jest chemokiną wydzielaną przez komórki stromalne, która odgrywa istotną rolę podczas neurogenezy poprzez wpływ na migrację i proliferację neuronalnych komórek progenitorowych. Dlatego też, postulujemy, że jej hamowanie może negatywnie wpłynąć na parakrynną rolę wywieraną przez DPSCs. CCL2 jest chemokiną promującą stan zapalny, stąd też hamowanie jej aktywności powinno nasilać korzystne efekty wywierane przez DPSCs, Natomiast, ponieważ zwiększona ekspresja CX3CL1 związana jest z procesem uczenia się, jej modulacja postulowana jest jako promująca poprawę funkcji poznawczych po udarze. Modelem zastosowanym w badaniach będą hodowle organotypowe hipokampa prowadzone w pożywce kondycjonowanej znad DPSCs, poddane doświadczalnemu modelowi udaru – deprywacji tlenu i glukozy (ang. oxygen-glucose deprivation – OGD). DPSCs zostaną scharakteryzowane z zastosowaniem cytometrii przepływowej oraz qRT-PCR. Analiza sekretomu w kondycjonowanych znad DPSCs pożywkach zostanie przeprowadzona przy użyciu spektrometrii mas. Hodowle organotypowe skrawków hipokampa, które stanowią model badawczy oddający strukturę tkanki nerwowej, ponieważ zawierają różne typy komórek mózgu (w tym neurony, mikroglej oraz astrocyty), prowadzone będą poprzez umieszczenie skrawków hipokampów szczurów w insertach w pożywce hodowlanej. Model OGD obejmie umieszczenie insertów z OHC w pożywce niezawierającej glukozy w atmosferze z zawartością tlenu 0% na 40 minut. Takie warunki są uznanym doświadczalnym modelem udaru niedokrwiennego, gdzie fragment mózgu pozbawiony jest tlenu oraz kluczowej dla jego aktywności glukozy. W kolejnym etapie za pomocą konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej zostanie określona morfologia skrawków po OGD oraz po modulacji receptorów chemokin z zastosowaniem ich antagonistów. Przeprowadzony zostanie również pomiar sił wiązania chemokin do ich receptorów w warunkach OGD i po modulacji ich receptorów, przy użyciu mikroskopii sił atomowych pracującej w trybie spektroskopii sił. Pozwoli to określić, jak zmienia się aktywność receptorów po niedokrwieniu, oraz ich modulacji przez antagonistów receptorów chemokin oraz działaniu parakrynnym DPSCs. Głównym wkładem w rozwój nauki będzie weryfikacja hipotezy czy CXCL12, CCL2 oraz CX3CL1 pełnią istotną rolę w parakrynnych efektach wywieranych przez komórki DPSCs na tkankę nerwową po udarze. Model OHC zapewni kompleksowe zbadanie interakcji nie tylko często badanych w tym kontekście neuronów ale w obrębie całej tkanki nerwowej *ex vivo*. Poznanie roli wybranych chemokin i modulacji ich receptorów – a szczególnie zahamowania aktywności prozapalnej CCL2 poprzez działanie Irbesartanu, może przyczynić się do rozwoju nowych terapii komórkowej chorób niedokrwiennych.