

Założenia naukowe/cel projektu: Zjawisko opóźnionego wszczepienia się krwiotwórczych komórek macierzystych (HSC), a nawet jego braku, po podaniu materiału przeszczepowego jest nadal poważnym problemem, głównie, jeśli liczba HSC w materiale przeszczepowym jest ograniczona (np. niska zawartość HSC w pobranym szpiku kostnym (BM), słaba procedura mobilizacji farmakologicznej, niska liczba HSC w krwi pępowinowej (UCB)). Zrozumienie mechanizmów determinujących procesy wszczepiania się HSC do niszy szpikowych ma zatem kluczowe znaczenie dla pomyślnych wyników leczenia pacjentów po przeszczepieniach krwiotwórczych. Strategie *ex vivo* mające na celu zwiększenie stopnia zasiedlania HSC mogą stanowić odpowiedź na poważny problem kliniczny w hematologii/onkologii. Poddamy weryfikacji eksperymentalnej strategii mającej na celu *i*) zwiększenie odpowiedzi migracyjnej przeszczepianych HSC do czynnika pochodzącego z komórek podścieliska 1 (SDF-1), sfingozyny-1-fosforanu (S1P) oraz zewnątrzkomórkowego trójfosforanu adenozy (eATP) oraz uwzględniając dane, iż terapia mieloablacyjna indukuje stan sterylnej zapalenia w szpiku kostnym (BM) *ii*) poddamy odpowiedniej modulacji ten proces w szpiku kostnym w celu poprawienia zasiedlenia/wszczepienia HSC w niszach krwiotwórczych.

Opis badań: Pionierskie prace naszego zespołu wykazały, iż receptory dla kluczowych czynników chemotaktycznych dla krwiotwórczych komórek macierzystych – CXCR4 dla chemokiny SDF-1, receptor S1P1 dla S1P, oraz receptor P2X7 dla eATP, dla optymalnego przekazania sygnału wewnątrzkomórkowego warunkującego migrację HSC do niszy krwiotwórczych szpiku kostnego muszą się lokalizować w domenach błonowych określanymi mianem trawetek lipidowych (ang. *membranę lipid rafts*, **MLR**). Domeny MLR powstają w odpowiedzi na aktywację oksydazy NADPH 2 (Nox2), która generuje reaktywne formy tlenu (ROS), bezpośrednio indukując aktywację inflamasomu Nlrp3. Zatem procesy migracji/wszczepiania HSC są regulowane w sposób zależny od osi Nox2-ROS-Nlrp3 inflamasom. Stąd **w Celu 1** projektu skupimy się na kontrolowanej modulacji osi Nox2-ROS-Nlrp3 celem zwiększenia potencjału migracyjnego krwiotwórczych komórek macierzystych. Uwzględniając dane, iż terapia mieloablacyjna przed przeszczepieniem, indukuje w szpiku kostnym biorcy stan sterylnej zapalenia, podczas którego dochodzi do uwolnienia szeregu mediatorów, które regulują procesy migracji HSC, **w Celu 2** ocenimy strategię poprawy stopnia zasiedlenia/wszczepienia się HSC po przeszczepie poprzez modyfikację mikrośrodowiska krwiotwórczego biorcy przeszczepu. **W Celu 3** zbadamy mechanizmy molekularne oraz komórkowe oddziaływań Nox2-ROS-Nlrp3 regulujące procesy migracji HSC oraz sterylnej zapalenia w mikrośrodowisku szpiku kostnego. W badaniach wykorzystamy dostępne modele zwierzęce posiadające mutacje genów Nox2, Nlrp3, oraz P2X7, molekularne modulatory Nox2, inflamasomu Nlrp3 oraz sygnałowania purynergicznego. Procesy wszczepiania się mysich oraz ludzkich HSC ocenimy wykorzystując dostępne *state-of the art* metody hematologii eksperymentalnej. Wykorzystamy również najnowocześniejsze strategię oczyszczania HSC oraz populacji komórek niszy krwiotwórczych. Celem oceny zmian w profilach transkryptomu, proteomu oraz metabolomu posłużymy się platformą NextSeq2000 oraz wysoko-rozdzielczym spektrometrem mas FT/MALDI-ICR-MS (Solarix 2xR 7T, Bruker) sprzężonym z UHPLC ESI-Q-TOF MS/MS.

Oczekiwane rezultaty: Zdolność migracji/zasiedlania krwiotwórczych komórek macierzystych podanych w materiale przeszczepowym do niszy szpiku kostnego poprzedzająca procesy ich długoterminowego wszczepienia, ma kluczowe znaczenie dla regeneracji krwiotwórczej. Poprawa wydajności zasiedlania HSC po przeszczepie jest ważnym wyzwaniem hematologii, którego optymalizacja może znacznie poprawić wyniki kliniczne. Procesy migracji/wszczepiania się HSC są regulowane przy udziale układu wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, który ulega aktywacji podczas terapii mieloablacyjnej, poprzedzającej przeszczepienie. Nasze niedawno opublikowane wyniki wskazują na udział osi Nox2-ROS-Nlrp3 inflamasom. Postulujemy, że proponowane strategię modulowania MLR i efektów biologicznych osi Nox2-ROS-Nlrp3 inflamasomu potencjalnie mogą znaleźć praktyczne zastosowanie w klinice w celu przyspieszenia zasiedlenia i wszczepienia krwiotwórczych komórek macierzystych. Przekładać się to będzie na lepsze wyniki kliniczne, uniknięcie powikłań poprzyszczepowych oraz skrócenie okresu hospitalizacji.