

Ocena zdolności do neuralnego różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z tkanki tłuszczowej (ADSC)



Klaudia Radoszkiewicz, Anna Figiel-Dąbrowska, Anna Sarnowska

Platforma Badań Translacyjnych w Zakresie Medycyny Regeneracyjnej, Zakład Bioinżynierii Komórek Macierzystych IMDiK PAN, Zakład Biochemii Klinicznej WUM



Kliniczne zastosowanie terapii komórkami macierzystymi jest nadal bardzo ograniczone. W przypadku nieuleczalnych chorób neurodegeneracyjnych terapia komórkowa wzbudza wielkie nadzieje, jednak nadal jest domeną przyszłości - dlatego też priorytetem jest opracowanie jednolitych standardów pozyskiwania i namnażania komórek macierzystych, a także dobór odpowiedniego środowiska i warunków sprzyjających ich neurogenезie [1,2].

Celem niniejszej pracy była :
 -optymalizacja warunków długoterminowej hodowli ADSC, pozwalających utrzymać ich wysoki stopień proliferacji i klonogenności
 -ocena ich potencjału neurogenego i neuroprotektynowego.

Wyniki

1. Charakterystyka ADSC

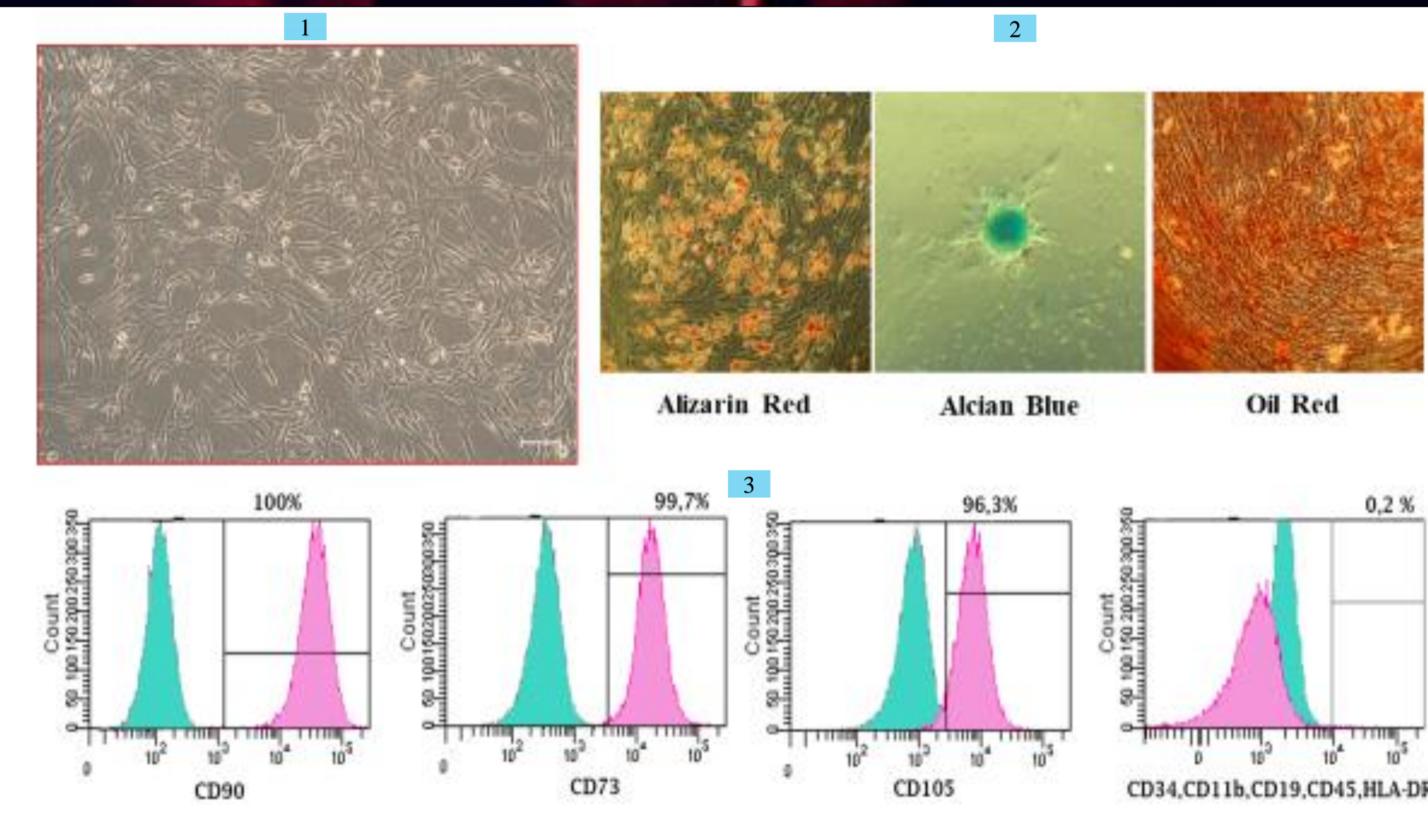


Fig. (1) ADSC w pasażu 0 wykazują cechy charakterystyczne dla MSC- fibroblastopodobny kształt i adhezję do plastiku. Skala 100 μ m.
 (2) Zdjęcia komórek zróżnicowanych w komórki mezodermy, wybarwione odpowiednimi barwnikami. (3) Charakterystyka fenotypowa ADSC. Histogramy analizy cytometrycznej mezenchymalnych markerów pozytywnych i negatywnych (CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR)

2. Ocena proliferacji, klonogenności i starzenia

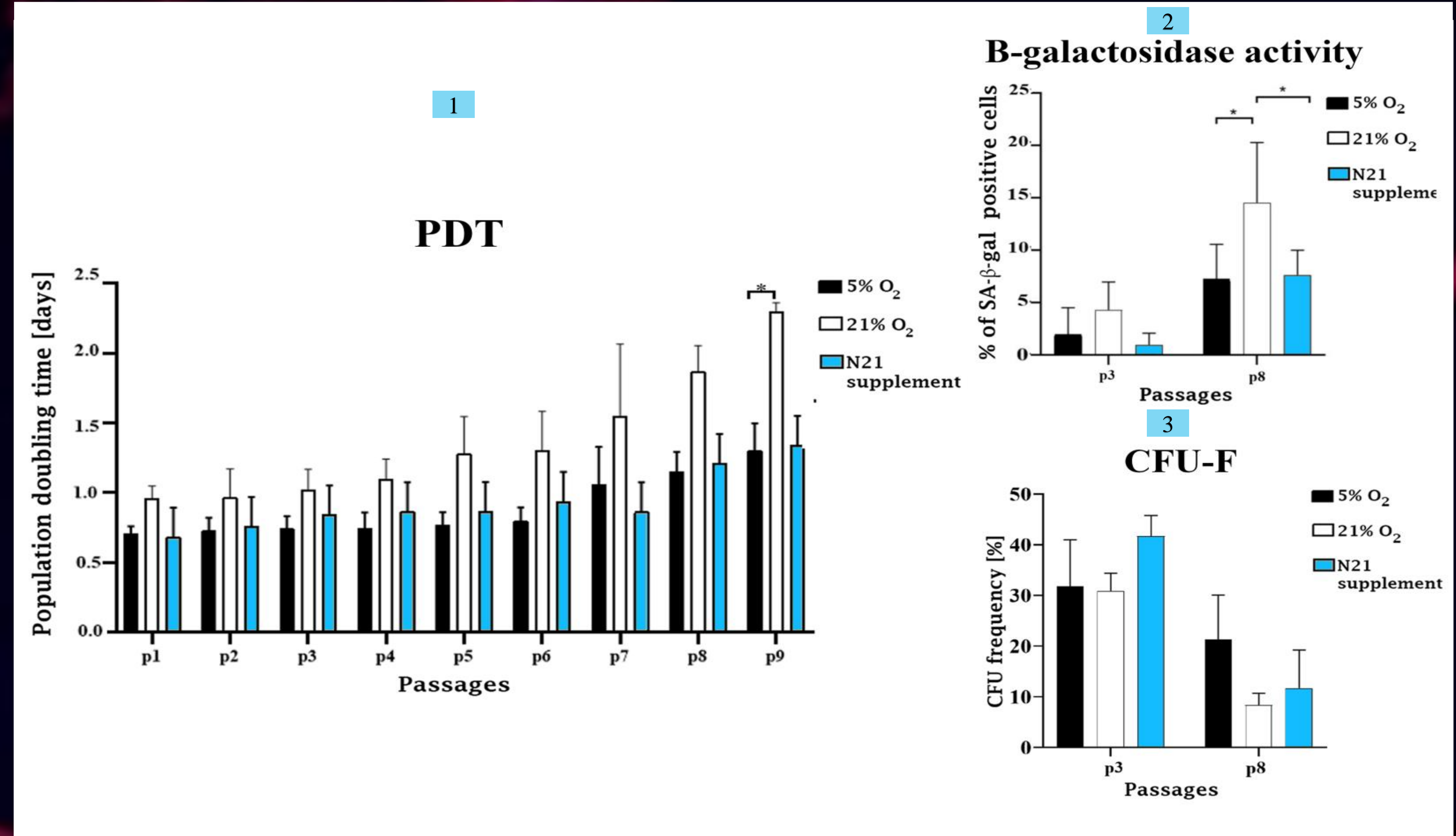


Fig. (1) Wpływ warunków tlenowych oraz suplementu N21 w pożywkę na długość czasu podwojenia populacji. (2) Wpływ warunków tlenowych oraz suplementu N21 w pożywkę na aktywność B-galaktozydazy. (3) Wpływ warunków tlenowych oraz suplementu N21 na tworzenie ośrodków tworzących kolonie CFU. Różnice były uznawane za istotne statystycznie gdy wartość $p < 0,05$. Poziom istotności statystycznej * - dla $0,01 < p < 0,05$; ** - dla $0,001 < p < 0,01$; *** - dla $0,0001 < p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

3. Ocena potencjału neurogenego

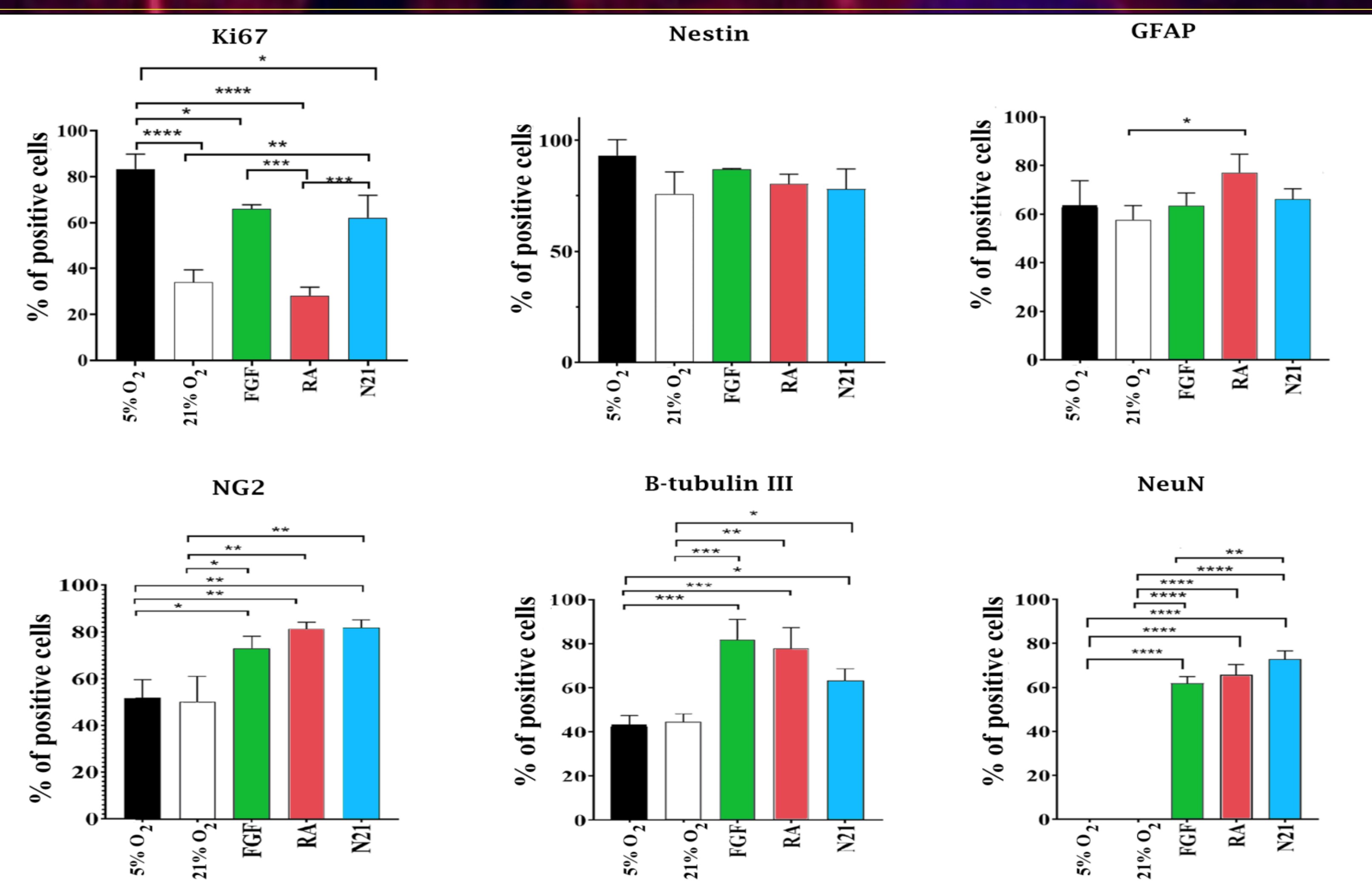


Fig. Wpływ poszczególnych warunków hodowli na obecność markerów proliferacji (Ki67) oraz neuralnych wykazany na podstawie przeprowadzonych barwień immunocytochemicznych. Różnice były uznawane za istotne statystycznie gdy wartość $p < 0,05$. Poziom istotności statystycznej * - dla $0,01 < p < 0,05$; ** - dla $0,001 < p < 0,01$; *** - dla $0,0001 < p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

4. Ocena potencjału neuroprotektynowego

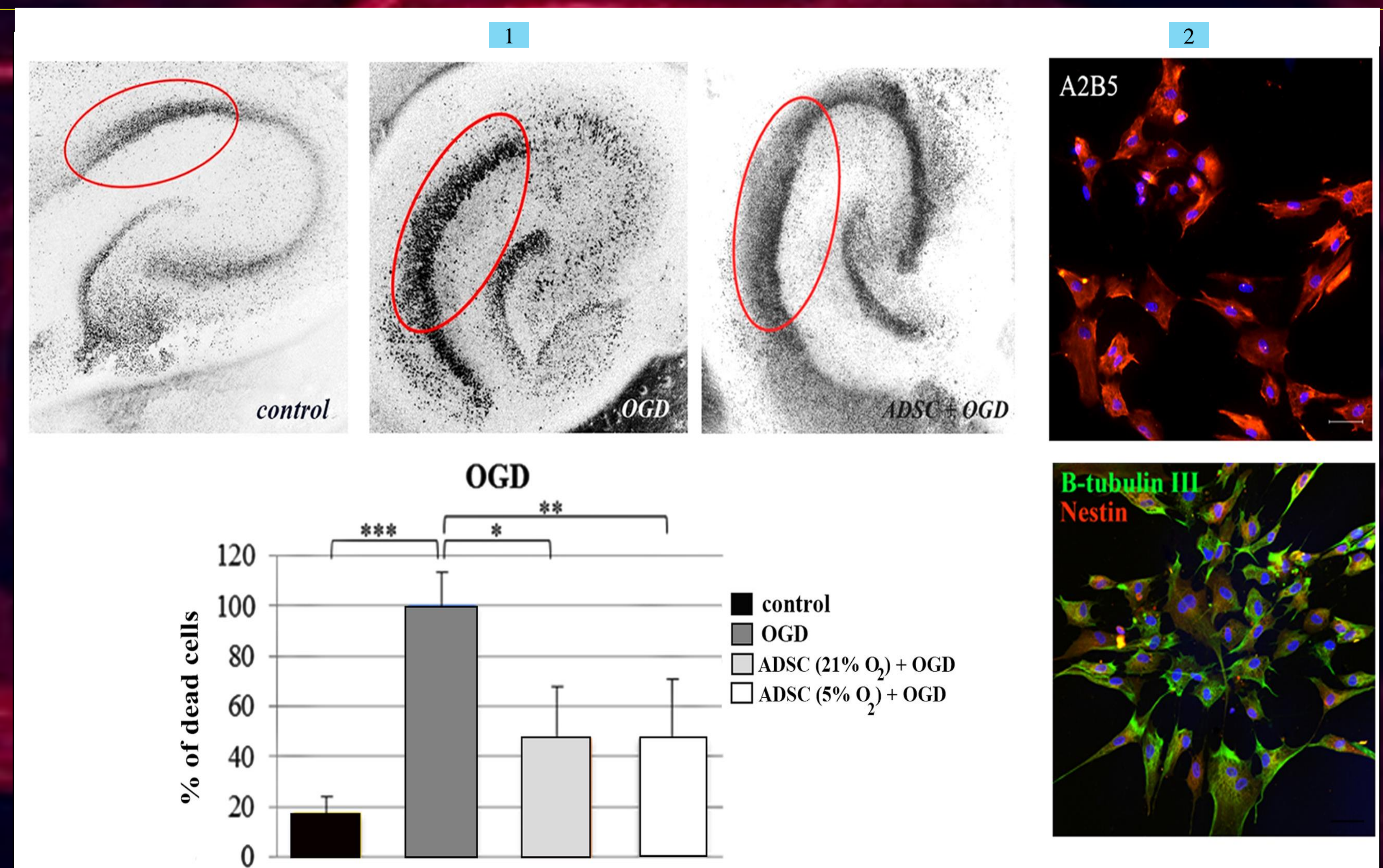


Fig. (1) Wpływ pośredniej współhodowli skrawków hipokampa po OGD z ADSC hodowanymi w warunkach 5% i 21% tlenu na śmiertelność komórek w strefie CA1. Różnice były uznawane za istotne statystycznie gdy wartość $p < 0,05$. Poziom istotności statystycznej * - dla $0,01 < p < 0,05$; ** - dla $0,001 < p < 0,01$; *** - dla $0,0001 < p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.
 (2) Charakterystyka fenotypowa ADSC pochodzących z współhodowli pośredniej z nieuszkodzonymi skrawkami hipokampa.

Wnioski

- Wykazano **korzystny wpływ fizjologicznego (5%) stężenia tlenu** na proliferację, klonogenność oraz starzenie ADSC.
- ADSC **nie posiadają** zdolności do spontanicznego różnicowania w kierunku neuralnym.
- Hodowla ADSC w pożywkach suplementowanych czynnikami różnicującymi **hamuje ich proliferację, ale umożliwia zróżnicowanie w trzy typy komórek neuralnych**.
- Czynniki wydzielane przez tkankę nerwową **stymulują ADSC do różnicowania neuralnego**.
- ADSC w obecności uszkodzonej tkanki nerwowej wykazują **efekt neuroprotektynowy oparty na ich działaniu adjuwantowym**.

Metodyka

Badania przeprowadzono na mezenchymalnych/stromalnych komórkach macierzystych pochodzących z materiału pozyskanego po zabiegu liposukcji od trzech pacjentów Oddziału Chirurgii Plastycznej Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego im. prof. W. Orłowskiego w Warszawie.

Do doświadczeń *ex vivo* wykorzystano 7-dniowe szczury pochodzące ze szczepu Wistar z hodowli Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej. Doświadczenia wykonywano zgodnie z procedurą zatwierdzoną przez Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach.

Bibliografia

- F. Hu i in., „MiR-218 Induces Neuronal Differentiation of ASCs in a Temporally Sequential Manner with Fibroblast Growth Factor by Regulation of the Wnt Signaling Pathway”, *Sci. Rep.*, t. 7, nr November 2016, ss. 1–11, 2017.
- T. Mukai, A. Tojo, and T. Nagamura-Inoue, “Mesenchymal stromal cells as a potential therapeutic for neurological disorders,” *Regenerative Therapy*, vol. 9, Japanese Society of Regenerative Medicine, pp. 32–37, Dec. 01, 2018, doi: 10.1016/j.reth.2018.08.001.