
mgr inż. Michał Stefan Lach

**Opracowanie metody różnicowania pluripotencjalnych komórek
macierzystych w kierunku progenitorów chondrocytów
w warunkach przedklinicznych**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. n.med. Wiktoria Maria Suchorska

Promotor pomocniczy: dr n. med. Katarzyna Kulcenty

Studium Medycyny Molekularnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Pracownia Radiobiologii, Wielkopolskie Centrum Onkologii im. Marii
Sklódowskiej-Curie w Poznaniu



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2020

Michał Lach
V. 11.

Streszczenie w języku polskim

Choroba zwyrodnieniowa stawów w niedalekiej przyszłości osiągnie status choroby cywilizacyjnej. Obecne sposoby leczenia uszkodzonej chrząstki stawowej (takie jak technika mikrozlamań lub autologiczna implantacja chondrocytów) stanowią rozwiązanie krótkotrwałe i nie chronią przed dalszym rozwojem choroby, a w konsekwencji przed koniecznością zastosowania bardziej inwazyjnych metod, jak np. alloplastyka stawów. Wykorzystanie technik inżynierii tkankowej, a w szczególności pluripotencjalnych komórek macierzystych (PSC), do których należą embrionalne komórki macierzyste (ESC) oraz indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPSC) może przyczynić się do udoskonalenia istniejących terapii. Zastosowanie komórek hESC budzi jednak wiele wątpliwości natury etycznej ze względu na ich pochodzenie i metodę ich pozyskiwania wymagającą zniszczenia rozwijającego się zarodka w stadium blastocysty. Opracowanie technologii otrzymywania iPSC na drodze reprogramowania komórek somatycznych otworzyło nowe możliwości na polu spersonalizowanej medycyny regeneracyjnej. Komórki iPSC wykazują cechy komórek macierzystych, ale proces ich uzyskiwania nie wymaga niszczenia blastocysty, zatem ich otrzymywanie nie wywołuje wątpliwości natury etycznej. W przypadku badań dotyczących regeneracji chrząstki stawowej z wykorzystaniem komórek iPSC brakuje odpowiedniego modelu przedklinicznego, tj. powtarzalnego protokołu ich różnicowania w ściśle zdefiniowanych warunkach hodowlanych bez dodatku produktów pochodzenia zwierzęcego (surowica, komórki odżywcze).

Celem niniejszej rozprawy było opracowanie protokołu różnicowania komórek PSC w kierunku chondrocytów w ściśle określonej pożywce hodowlanej z ograniczoną suplementacją czynników wzrostowych oraz modyfikacją warunków środowiskowych zapewniających efektywny proces chondrogenyzy.

W początkowym etapie dokonano zbadania wpływu TGF- β 1 oraz BMP2 na uformowanie prochondrogennych sfer z wykorzystaniem linii embrionalnych komórek macierzystych BG01V. Zaobserwowano obniżenie poziomu ekspresji markeru komórek pluripotencjalnych (*NANOG*) oraz wzrost poziomu ekspresji markerów związanych z chondrogenezą (*BRACHYURY*, *COL2A1*). Barwienia immunohistochemiczne sfer wykazały łagodne do umiarkowanych intensywności poszczególne odczynów: błękitu alcjanu oraz toluidyny, czerwieni safraninowej, barwień trójbarwnych wg. Massona oraz Verheoffa-van Giesson, świadczących o depozycji proteoglikanów oraz obecności kolagenów w tym typowego dla chondrocytów chrząstki szklistej - kolagenu typu II. Ze względu na wysoką

ekspresję *BRACHYURY* (marker mezodermalny) oraz *NANOG* (możliwość uformowania potworniaka) postanowiono znaleźć alternatywną metodę uzyskania komórek możliwych do zastosowania przedklinicznego.

W tym celu podjęto się ulepszeniu metodyki różnicowania chondrogenego linii BG01V z zastosowaniem etapu formowania kul zarodkowych. Modyfikacja masy komórkowej pozwoliła na uzyskanie kul zarodkowych na wczesnym etapie różnicowania promezodermalnego, co przełożyło się na zwiększenie efektywności różnicowania chondrogenego (podwyższona ekspresja genów dla markerów chondrogenych i obniżona dla markerów pluripotencjalnych). Analiza barwień immunofluorescencyjnych zróżnicowanej hodowli potwierdziła obecność markerów komórek chondrocytopodobnych (obecność kolagenu typu II, SOX9, siarczan chondroityny) i komórek pluripotencjalnych (*NANOG*). Jednakże, ze względu na obecność surowicy bydlęcej w pożywce hodowlanej, komórki odżywcze oraz dużą heterogenność komórek, możliwość zastosowania niniejszej metody w badaniach przedklinicznych została wykluczona.

W celu zwiększenia potencjału do zastosowania klinicznego, zmodyfikowano protokół poprzez zmianę czasu różnicowania oraz zastosowanie hodowli trójwymiarowej, która jest bliższa naturalnemu procesowi rozwoju chrząstki stawowej niż hodowla w systemie dwuwymiarowym. Komórki pluripotencjalne (linie komórkowe BG01V - linia hESC; GPCCi001-A oraz ND 41658*H – linie iPSC) różnicowano w określonych warunkach hodowli bez komponentów zwierzęcych i surowicznych. W wyniku wydłużenia protokołu do 35 dni oraz dodania etapu hodowli trójwymiarowej uzyskano populacje charakteryzujące się wczesnym etapem chondrogeny (kondensacja mezenchymalna). Modyfikacje te pozwoliły również na uzyskanie zwiększonej depozycji proteoglikanów (analiza półilościowa intensywności wybarwienia błękitem alcjanu oraz siarczanem chondroityny). Ponadto, analiza ekspresji markerów komórek pluripotencjalnych z wykorzystaniem barwień immunofluorescencyjnych wykluczyła ich obecność, co sugeruje powstanie bardziej homogennej populacji komórek na wczesnym etapie chondrogeny.

Opracowana metoda pozwoliła na uzyskanie populacji progenitorów chondrocytów z komórek iPSC w ściśle zdefiniowanych warunkach hodowlanych, co może stanowić podstawę ich zastosowania jako modelu przedklinicznego do dalszych badań.