

STRESZCZENIE

Komórki macierzyste posiadają zdolność do samoodnawiania się i różnicowania w wyspecjalizowane komórki wszystkich tkanek organizmu. Wśród komórek macierzystych wyodrębnia się populację dojrzałych komórek macierzystych (organizmu dorosłego) uważanych za swoistą rezerwę tkankową dla poszczególnych narządów. Rezerwuary tkankowe stały się nadzieją dla medycyny regeneracyjnej. Miogenne komórki macierzyste to dojrzałe komórki macierzyste zdolne do różnicowania się we włókna mięśniowe. Mają potencjał stymulowania i wspierania endogennych mechanizmów naprawczych mięśni szkieletowych ale także mięśnia sercowego, a tym samym stanowią podstawę dla prób regeneracji tkanek serca uszkodzonych po zawale. Ta grupa komórek macierzystych organizmu dorosłego, ze względu na stosunkowo duże bezpieczeństwo ich użycia, staje się niekontrowersyjna w zastosowaniu. Główne zagrożenia związane z transplantacją dorosłych SCs są rzadkie, zwykle możliwe do opanowania i podobne dla wszystkich biologicznych produktów terapeutycznych. Atutem staje się dostępność niektórych kandydatów komórkowych, ich łatwość w izolacji i hodowli *in vitro*.

Aby uzyskać możliwie najlepszy efekt terapeutyczny, natywny materiał biologiczny jakim są dorosłe komórki macierzyste okazuje się jednak niewystarczający i obecna medycyna regeneracyjna pokłada duże nadzieje w modyfikacjach genetycznych, adaptacjach hodowlanych i prekondycjonowaniu *in vitro* komórek macierzystych.

Zawarte w pracy badania obejmowały zastosowanie modyfikacji wobec ludzkich komórek macierzystych (SKMS/PCs) przy zastosowaniu hodowali *in vitro* w warunkach hipoksji oraz modyfikacji genetycznych m.in. poprzez wywołanie nadekspresji genu antyoksydacyjnego *SOD3*, oraz prekondycjonowanie egzogennym związkiem chemicznym PBN i inhibicję mikro RNA-195.

- i) Hodowla *in vitro* komórek macierzystych pochodzenia mięśniowego w warunkach hipoksji, wzmacniała endogenne mechanizmy obronne komórek, tym samym poprawiała ich przeżywalność w warunkach *in vivo*. Warunki hodowli odpowiadały tym samym, co panującym w sercu pozawałowym co miało wpływać pozytywnie na ewentualną adaptację komórek *in vitro* do warunków panujących w obrębie blizny pozawałowej.
- ii) Modyfikacje DNA stosowane są w celu wzmagania czynników terapeutycznych, normalnie uwalnianych; różnego typu szlaków sygnałowych i/lub białek regulujących procesy życiowe komórek. Antyoksydant enzymatyczny, *SOD3* jest głównym kandydatem spośród grupy enzymów antyoksydacyjnych, które detoksykują rodniki

ponadtlenkowe do nadtlenu wodoru i tlenu. Należy do macierzy zewnątrzkomórkowej, zapobiega inaktywacji NO uwalnianego ze śródbłonna, jest szczególnie interesujący ze względu na dłuższy okres półtrwania oraz brak epitopów dla wiązania immunoglobuliny E (IgE). Obecnie nie ma doniesień na temat reaktywności ludzkiego SOD3 z komórkami układu odpornościowego, co sugeruje bezpieczeństwo stosowania nadekspresji ludzkiego SOD3 w warunkach klinicznych.

- iii) Do najprostszych i najmniej kosztownych podejść dla modyfikacji warunków hodowli komórkowej *in vitro* jest wstępne pre-kondycjonowanie środkami farmakologicznymi. Prowadzi to do poprawy aktywności terapeutycznej stosowanych komórek macierzystych, poprzez dodatkowe stymulowanie uwalniania czynników parakrynnych, korzystnych w regeneracji serca pozawałowego. Antyoksydant egzogeny PBN czyli N-tert-butylo- α -fenylnitron należy do tzw. pułapek spinowych (spin-traps), którego mechanizm działania przebiega na różnych szlakach komórkowych w celu zmiany stanu redoks poprzez wymiatanie ROS lub groźnych reaktywnych form azotu (ROS/RNS).
- iv) Mikro RNA (mi-RNA) to małe, 20-25-nukleotydowe niekodujące RNA, które odgrywają kluczową rolę w różnych procesach komórkowych, w tym: w proliferacji i sygnalizacji komórkowej i związanej z tymi procesami ekspresji różnych genów. W porównaniu z modyfikacjami na poziomie DNA, zastosowanie mi-RNA daje możliwość wywołania efektów przejściowych, które okresowo mogą poprawiać właściwości terapeutyczne komórek macierzystych. Ponieważ nie są wymagane żadne zmiany w genomie, ta modyfikacja staje się także korzystniejsza pod względem biologicznym, będąc neutralną wobec genomu.

W przedstawionych badaniach oceniono wpływ przeprowadzanych modyfikacji na miogenność, potencjał proliferacyjny, zdolność do formowania miotub, starzenie się populacji komórek, poziom apoptozy, ekspresje wybranych genów antyoksydacyjnych, antystarzeniowych i antyapoptotycznych, oraz genów miogennych i tych samych czynników na poziomie białka. Obserwowano również wpływ zastosowanej modyfikacji na długość telomerów. Celem badań było wyodrębnienie najbardziej optymalnego protokołu hodowlanego, lub późniejsze zastosowanie kilku podejść jednocześnie dla wdrożenia terapii komórkowej do badań przedklinicznych. Wyodrębniony protokół będzie mógł zostać oceniony w modelu mysim serca pozawałowego, co zostało już przeprowadzone z pozytywnymi wynikami.

Podsumowując, przedstawione badania przyczyniają się do stwierdzenia, iż komórki pochodzące z mięśni szkieletowych, transfekowane stabilnie *SOD3* oraz preconditionowane PBN, hodowane *in vitro* w warunkach hipoksji posiadają lepszy potencjał hodowlany i wydajniejszą adaptację do warunków stresowych. Jednoczesne zastosowanie kilku podejść kandydujących może być obiecującym krokiem w leczeniu serca pozawałowego.