

lek. Karolina Salwierał – Główna

**Wpływ płynu mózgowo-rdzeniowego i środowiska
oligodendrocytarnej linii komórkowej na sekretom
mezenchymalnych komórek macierzystych z galarety Whartona
w kontekście patologii stwardnienia rozsianego.**

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych w dziedzinie neurologii

Promotor: dr hab. n. med. Prof. UM Mariola Świderek - Matysiak

Katedra i Klinika Neurologii

Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Streszczenie /Abstract

Stwardnienie rozsiane (sclerosis multiplex, SM) dotyczy w większości młodych osób dorosłych i stanowi najczęstszą neurologiczną przyczynę niesprawności w tej grupie co czyni z niej istotny problem, także w ujęciu społeczno-ekonomicznym. Leczenie SM, pomimo ciągłego rozwoju farmakoterapii, w przypadku postępujących postaci choroby, kiedy proces neurodegeneracyjny dominuje nad zapalnym nadal pozostaje wyzwaniem. Terapia komórkowa w SM rozwija się jako próba odpowiedzi na te problemy. Komórki macierzyste pozyskiwane z galarety Whartona (ang. *Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells*, WJ-MSC) stanowią interesującą populację komórek macierzystych ze względu na łatwość izolacji, wysoki potencjał proliferacyjny oraz niską immunogenność, jednocześnie ich pochodzenie nie budzi kontrowersji natury etycznej. Celem pracy była ocena składu sekretomu WJ-MSC oraz jego modyfikacji pod wpływem środowiska płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR) pochodzącego od chorych z SM (SM PMR) oraz kontroli (kontrolny PMR), a także pod wpływem interakcji z komórkami oligodendrogleju linii komórkowej MO3.13. Nadsącza otrzymane z poszczególnych hodowli zbadano za pomocą testów Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Assays (Bio-Rad Laboratories, USA) dla 27 czynników. Uzyskane wyniki analizowano przy użyciu programu Statistica 13.1, (Tibco, Palo Alto, CA, USA).

Sekretom WJ-MSC okazał się bogaty w mediatory odpowiedzi immunologicznej – wykazano obecność wszystkich badanych cytokin, chemokin i czynników wzrostu, uwagę zwracały zwłaszcza wysokie poziomy IL-6, IL-8, IP-10 i MCP-1. Kondycjonowanie hodowli WJ-MSC z użyciem PMR przyniosło redukcję stężeń większości wydzielanych czynników. Obserwowano jedynie niewielki wzrost stężeń IL-12 oraz RANTES w hodowli WJ-MSC z SM PMR w porównaniu do sekretomu WJ-MSC. Istotnie statystycznie spadki średnich stężeń dotyczyły: IL-4, IL-6, IL-8, eotaksyny i VEGF w przypadku sekretomu WJ-MSC + SM PMR vs WJ-MSC oraz IL-1b, IL4, IL6, IL9, eotaksyny, G-CSF, VEGF w przypadku sekretomu WJ-MSC + kontrolny PMR vs WJ-MSC. Brak istotnych różnic pomiędzy sekretomami WJ-MSC + SM PMR vs WJ-MSC + kontrolny PMR wskazuje, że rodzaj zastosowanego PMR nie miał znaczenia dla tego procesu. Analiza stężeń badanych czynników układu immunologicznego w nadsączach uzyskanych z hodowli WJ-MSC + MO3.13, pokazała, że również w tym wypadku sekretom uzyskany z wspólnej hodowli był uboższy w cytokiny, chemokiny i czynniki wzrostu w stosunku do hodowli WJ-MSC. Uzyskano istotnie wyższe stężenia eotaksyny i RANTES oraz istotny spadek stężenia IL-1b, IL-6, IL-8, IL-9, IL-15, IL-17, IFN- γ , MCP-1, G-CSF, FGF, VEGF w hodowlach WJ-MSC + MO3.13 w porównaniu do sekretomu WJ-MSC.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazały na dużą zmienność sekretomu WJ-MSC pod wpływem kontaktu z PMR i komórkami oligodendrogleju. Zubożenie sekretomu jest prawdopodobnie związane z uruchomieniem mechanizmów różnicowania WJ-MSC. Potrzebne są dalsze badania nad składem sekretomu WJ-MSC oraz możliwościami jego modyfikacji, by stanowił powtarzalny, bezpieczny i efektywny element terapii w SM.

Publikacja związana z tematem pracy:

Salwiera-Główna K, Piątek P, Domowicz M, Świderek-Matysiak M. Effect of Multiple Sclerosis Cerebrospinal Fluid and Oligodendroglia Cell Line Environment on Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells Secretome. *Int J Mol Sci.* 2022 Feb 16;23(4):2177. doi: 10.3390/ijms23042177. PMID: 35216294; PMCID: PMC8878514.

Multiple sclerosis (MS) affects mostly young adults and is the most common neurological cause of disability in this group, which makes it a significant problem, also in socio-economic terms. Treatment of MS, despite the continuous development of pharmacotherapy, in the case of progressive forms of the disease, when the neurodegenerative process dominates over the inflammatory process, remains a challenge. Cell therapy in MS is developing as an attempt to address these problems. Stem cells obtained from Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ- MSC) are an interesting population of stem cells due to the ease of isolation, high proliferative potential and low immunogenicity, while their origin is not ethically controversial. The aim of the study was to assess the composition of the WJ- MSC secretome and its modification under the influence of the cerebrospinal fluid (CSF) environment from patients with MS (SM CSF) and control (control CSF), as well as under the influence of interaction with oligodendroglial cells of the MO3.13 cell line. Supernatants from individual cultures were tested using the Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Assays (Bio-Rad Laboratories, USA) for 27 factors. The obtained results were analyzed using Statistica 13.1, (Tibco, Palo Alto, CA, USA).

WJ- MSC secretome turned out to be rich in mediators of the immune response - the presence of all tested cytokines, chemokines and growth factors was demonstrated, especially high levels of IL-6, IL-8, IP-10 and MCP-1 were noted. Conditioning the WJ- MSC cultures with CSF resulted in a reduction in concentrations of most secreted factors. Only a slight increase in IL-

IL-12 and RANTES concentrations were observed in the WJ-MSC culture with SM CSF compared to the WJ-MSC secretome. Statistically significant decreases in mean concentrations concerned: IL-4, IL-6, IL-8, eotaxin and VEGF in the case of WJ-MSC + MS CSF secretome vs WJ-MSC secretome and IL-1b, IL4, IL6, IL9, eotaxin, G-CSF, VEGF for WJ-MSC + control CSF secretome vs WJ-MSC secretome. The lack of significant differences between the secretomes of WJ-MSC + MS CSF vs. WJ-MSC + control CSF indicates that the type of CSF used was not relevant for this process. The analysis of the concentrations of the tested factors of the immune system in the supernatants obtained from the WJ-MSC + MO3.13 culture showed that also in this case secretome obtained from the coculture was poorer in cytokines, chemokines and growth factors in relation to the WJ-MSC culture. Significantly higher concentrations of eotaxin and RANTES and a significant decrease in the concentration of IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-15, IL-17, IFN- γ , MCP-1, G-CSF, FGF, VEGF were obtained in WJ-MSC + MO3.13 cultures compared to the WJ-MSC secretome.

The results of the experiments showed a high variability of the WJ-MSC secretome under the influence of contact with CSF and oligodendroglial cells. Secretome depletion is probably related to the activation of WJ-MSC differentiation mechanisms. Further research is needed on the composition of the WJ-MSC secretome and the possibilities of its modification to make it a repeatable, safe and effective element of MS therapy.