

Streszczenie

Jedną z głównych przyczyn występowania niepełnosprawności są choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroba Parkinsona, Alzheimerera czy też choroba Huntingtona. Pomimo prowadzonych badań opcje terapeutyczne dla danej grupy schorzeń nadal są ograniczone do leczenia objawowego, a sam mechanizm choroby nie jest dobrze poznany. Przyczyną tych limitacji jest m.in. ograniczona zdolność mózgu do regeneracji, prowadząca również do braku dostępności komórek neuronalnych, które mogą być wykorzystywane w celach badawczych i w terapiach komórkowych. Idealnym rozwiązaniem tego problemu wydaje się opracowanie nowej techniki pozyskiwania komórek neuronalnych. W tym celu naukowcy stworzyli procedurę neuronalnej transdiferencjacji, która umożliwia pozyskiwanie neuronów z innych komórek somatycznych, takich jak fibroblasty. Do tej pory opracowano wiele metodyk przeprowadzania transróżnicowania, jednak ich efektywność, czasochłonność i inwazyjne techniki pozyskiwania komórek somatycznych pozostawiają pole do udoskonalenia i ograniczają zastosowanie ich w warunkach klinicznych. Ponadto mechanizm procedury pozostaje nie w pełni wyjaśniony i wymaga lepszego zrozumienia.

Celem niniejszej pracy było porównanie efektywności, kosztu i czasu potrzebnego do przeprowadzenia chemicznej transdiferencjacji monocytów w neurony oraz opracowanie na tej podstawie nowej, optymalnej procedury.

Monocyty użyte w badaniu zostały wyizolowane z kożuszków leukocyтарно-пłytkowych przy użyciu kuleczek magnetycznych, a ich fenotypowania dokonano z zastosowaniem cytometrii przepływowej. W celu przeprowadzenia neuronalnej transdiferencjacji komórki zostały wysiane w 8-komorowych szkiełkach podstawowych i inkubowane w medium indukującym I przez 6 dni lub w medium indukującym II przez 7 dni. Następnie medium zostało wymienione na medium dojrzewające I, medium dojrzewające II lub medium dojrzewające III w zależności od testowanej metodyki. Komórki były inkubowane przez 10 dni, po czym przeprowadzono tygodniową inkubację indukowanych komórek w medium pozbawionym dodatku małych molekuł. Komórki zostały scharakteryzowane przy użyciu przeciwciał dla MAP2, TUJ1, ASCL1 i CD14 w barwieniu immunofluorescencyjnym. Ponadto relatywny poziom ekspresji genów MAP2, TUBB3, ASCL1 i CD14 został określony z zastosowaniem RT-qPCR. Morfologia komórek była obserwowana każdego dnia eksperymentu.

Po 17 dniach inkubacji monocytów w mediach opracowanych dla metodyki 3 pozyskano neuronalne komórki TUJ1⁺ MAP2⁺ SYP⁺. Relatywny poziom ekspresji genów neuronalnych MAP2 i TUBB3 również był zwiększony i był porównywalny do poziomu obserwowanego dla komórek SH-SY5Y – kontroli pozytywnej. Stosowane media zawierały dodatek następujących małych molekuł: chir99021, forskolina, Y-27632, VPA, A83-01, TTNPB, NaB, cAMP i witamina C. Podobnie stosując metodykę 4 również uzyskano TUJ1⁺ MAP2⁺ SYP⁺ komórki neuronalne w 17 dni, jednak wykazywały niższy poziom ekspresji genów neuronalnych, w porównaniu do komórek indukowanych metodyką 3. Media stosowane w metodyce 4 były wzbogacone następującymi małymi molekułami: chir99021, forskolina, Y-27632, VPA, A83-01, TTNPB, NaB, dorsomorfina. Nie zaobserwowano komórek neuronalnych w eksperymencie przeprowadzonym według metodyki 1 i metodyki 2. Po tygodniowej inkubacji indukowanych komórek neuronalnych w medium pozbawionym dodatku małych molekuł, poziom ekspresji badanych genów neuronalnych uległ znacznemu zmniejszeniu bądź przestał być wykrywany. Podobnie nie wykryto sygnałów fluorescencyjnych dla MAP2 i TUJ1.

Uzyskane wyniki wykazują, że zastosowanie mediów hodowlanych wzbogaconych następującymi małymi molekułami: chir99021, forskolina, Y-27632, VPA, A83-01, TTNPB, NaB, cAMP i witamina C, umożliwia przeprowadzenie transdiferencjacji monocytów w neurony w 17 dni. Ponadto zaprezentowane wyniki wskazują na istotną rolę szlaku RAR w procesie neuronalnej transdiferencjacji monocytów.