

**POMORSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY  
W SZCZECINIE**



**mgr Kornelia Jankowska**

**Analiza porównawcza i optymalizacja procedury transdyferencjacji  
monocytów w neurony z wykorzystaniem wyłącznie małych molekul**

**Comparative analysis and optimization of the procedure of monocyte  
transdifferentiation into neurons using only small molecules**

Rozprawa doktorska w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu

Dyscyplina nauki medyczne

Promotor: Prof. hab. dr med. Marek Łos

Promotor pomocniczy: Dr n. med. Jolanta Hybiak

**Szczecin 2024**



***Podziękowania***

*Składam serdeczne podziękowania dla promotora  
**Pana prof. hab. dr med. Marka Łos,**  
za wyrozumiałość, zaufanie, wiarę w moje możliwości  
i udzielanie pomocy w trakcie powstawania mojej pracy.*

*Promotora pomocniczego  
**Pani dr n. med. Jolanty Hybiak,**  
za cierpliwość, wsparcie merytoryczne i praktyczne  
w trakcie przeprowadzania i planowania doświadczeń, oraz  
za motywację do poszerzania wiedzy i bycia lepszym naukowcem.*

*Pragnę podziękować również mojej rodzinie i partnerowi,  
za motywację i wsparcie w chwilach zwątpienia.*

*Dzięki Wam wszystko staje się możliwe.*

## Spis treści

Wykaz skrótów .....	6
1. Wstęp.....	8
1.1. Transdyferencjacja i reprogramowanie.....	8
1.2. Rodzaje komórek wyjściowych stosowanych w procedurze transdyferencjacji neuronalnej.....	10
1.3. Sposoby indukcji procesu transdyferencjacji.....	11
1.4. Mechanizm procesu chemicznej transdyferencjacji neuronalnej .....	14
1.4.1. Mechanizm działania wybranych małych molekuł stosowanych w procesie transdyferencjacji neuronalnej .....	15
1.5. Zastosowania dla procesu transdyferencjacji w neurologii .....	17
2. Cel pracy .....	20
3. Materiały i metody .....	21
3.1. Izolacja monocytów.....	21
3.1.1. Izolacja monocytów z kożuszków leukocytno-płytkowych.....	21
3.1.2. Określenie czystości populacji wyizolowanych monocytów .....	22
3.2. Hodowle komórkowe.....	22
3.2.1. Hodowla komórek SH-SY5Y .....	22
3.2.2. Przygotowanie naczyń hodowlanych do wysiewu monocytów .....	23
3.2.3. Wysiew monocytów.....	23
3.2.4. Transdyferencjacja z zastosowaniem metodyki 1 .....	23
3.2.5. Transdyferencjacja z zastosowaniem metodyki 2 .....	25
3.2.6. Transdyferencjacja z zastosowaniem metodyki 3 .....	26
3.2.7. Transdyferencjacja z zastosowaniem metodyki 4 .....	27
3.3. Obserwacja morfologii komórek.....	28
3.4. Izolacja RNA.....	28
3.5. RT-qPCR.....	29
3.6. Barwienie immunofluorescencyjne .....	29
3.7. Analiza statystyczna .....	30
4. Wyniki .....	31
4.1. Czystość wyizolowanej populacji monocytów .....	31
4.2. Transdyferencjacja monocytów z zastosowaniem metodyki 1 .....	31
4.2.1. Zmiany morfologiczne indukowanych komórek.....	31
4.2.2. Zmiany indukowanych komórek na poziome genetycznym.....	33

4.2.3. Zmiany indukowanych komórek na poziomie białkowym .....	34
4.3. Transdiferencjacja monocytów z zastosowaniem metodyki 2 .....	36
4.3.1. Zmiany morfologiczne indukowanych komórek .....	36
4.3.2. Zmiany indukowanych komórek na poziomie genetycznym .....	37
4.3.3. Zmiany indukowanych komórek na poziomie białkowym .....	38
4.4. Transdiferencjacja monocytów z zastosowaniem metodyki 3 .....	40
4.4.1. Zmiany morfologiczne indukowanych komórek .....	40
4.4.2. Zmiany indukowanych komórek na poziomie genetycznym .....	41
4.4.3. Zmiany indukowanych komórek na poziomie białkowym .....	42
4.5. Transdiferencjacja monocytów z zastosowaniem metodyki 4 .....	44
4.5.1. Zmiany morfologiczne indukowanych komórek .....	44
4.5.2. Zmiany indukowanych komórek na poziomie genetycznym .....	45
4.5.3. Zmiany indukowanych komórek na poziomie białkowym .....	46
4.6. Porównanie badanych metodyk transdiferencjacji monocytów w komórki neuronalne na poziomie genetycznym .....	48
4.6.1. Indukcja .....	48
4.6.2. Dojrzewanie .....	50
4.6.3. Komórki transróżnicowane .....	52
4.6.4. Hodowla .....	54
4.6.5. Zestawienie ekspresji poszczególnych genów na wszystkich etapach przeprowadzonych metodyk transdiferencjacji monocytów, w komórki neuronalne .....	55
5. Dyskusja .....	56
6. Wnioski .....	62
7. Piśmiennictwo .....	63
8. Streszczenie .....	74
9. Summary .....	76
10. Wykaz rycin .....	78
11. Wykaz tabel .....	80
12. Suplement .....	81

## Wykaz skrótów

AA	koktajl antybiotyków (ang. <i>Antibiotic-Antimycotic</i> )
AC	cyklaza adenylanowa (ang. <i>adenylate cyclase</i> )
ALS	stwardnienie zanikowe boczne (ang. <i>amyotrophic lateral sclerosis</i> )
ATP	adenozynotrójfosforan
BDNF	czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (ang. <i>brain derived neurotrophic factor</i> )
BMP	białko morfogenetyczne kości (ang. <i>bone morphogenetic protein</i> )
BSA	albumina surowicy bydłej (ang. <i>bovine serum albumin</i> )
cAMP	cykliczny adenozy-3',5'-monofosforan (ang. <i>cyclic adenosine monophosphate</i> )
Ct	numer cyklu, w którym fluorescencja badanej próbki osiąga poziom linii progowej (ang. <i>cycle threshold</i> )
DAPI	4',6-diamidyno-2-fenylindol
DMSO	dimetylosulfotlenek
ERK	ang. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FBS	płodowa surowica bydła (ang. <i>fetal bovine serum</i> )
GDNF	czynnik neurotroficzny pochodzący z linii komórek glejowych (ang. <i>glial cell line derived neurotrophic factor</i> )
HDAC	deacetylaza histonowa (ang. <i>histone deacetylase</i> )
IF	barwienie immunofluorescencyjne
IGF	insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (ang. <i>insulin like growth factor</i> )
iN	indukowane neurony
iPSC	indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. <i>induced pluripotent stem cells</i> )
KIM 1	komórki indukowane metodyką 1
KIM 2	komórki indukowane metodyką 2
KIM 3	komórki indukowane metodyką 3
KIM 4	komórki indukowane metodyką 4
MAP2	białko związane z mikrotubulami 2 (ang. <i>microtubule-associated protein 2</i> )

M-CSF	czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (ang. <i>macrophage colony-stimulating factor</i> )
MD I	medium dojrzewające I
MD II	medium dojrzewające II
MD III	medium dojrzewające III
MI I	medium indukujące I
MI II	medium indukujące II
MN	medium neuronalne
MNC	komórki jednojądrzaste pozyskiwane z krwi (ang. <i>mononuclear cells</i> )
NT3	neurotrofina-3
PBS	roztwór soli fizjologicznej (ang. <i>phosphate buffered saline</i> )
PSC	pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. <i>pluripotent stem cells</i> )
qPCR	ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. <i>quantitative polymerase chain reaction</i> )
RA	kwasy retinoidowe (ang. <i>retinoic acid</i> )
RAR	receptory kwasu retinoidowego (ang. <i>retinoic acid receptors</i> )
ROCK	szlak kinazy zależnej od Rho (ROCK – ang. <i>Rho-associated coiled-coil containing kinase</i> )
ROS	reaktywne formy tlenu (ang. <i>reactive oxygen species</i> )
RT	odwrotna transkrypcja (ang. <i>reverse transcription</i> )
SM	małe molekuly (ang. <i>small molecules</i> )
SYP	synaptofizyna
TF	czynniki transkrypcyjne (ang. <i>transcription factors</i> )
TGF- $\beta$	transformujący czynnik wzrostu- $\beta$ (ang. <i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i> )
TUJ1	białko cytoszkieletu $\beta$ -III tubuliny (ang. <i>cytoskeletal protein <math>\beta</math>-III tubulin</i> )
UDC	komórki pozyskane z moczu (ang. <i>urine derived cells</i> )
UTR	niekodujący rejon mRNA (ang. <i>untranslated region</i> )
VPA	kwasy walproinowe (ang. <i>valproic acid</i> )

## 1. Wstęp

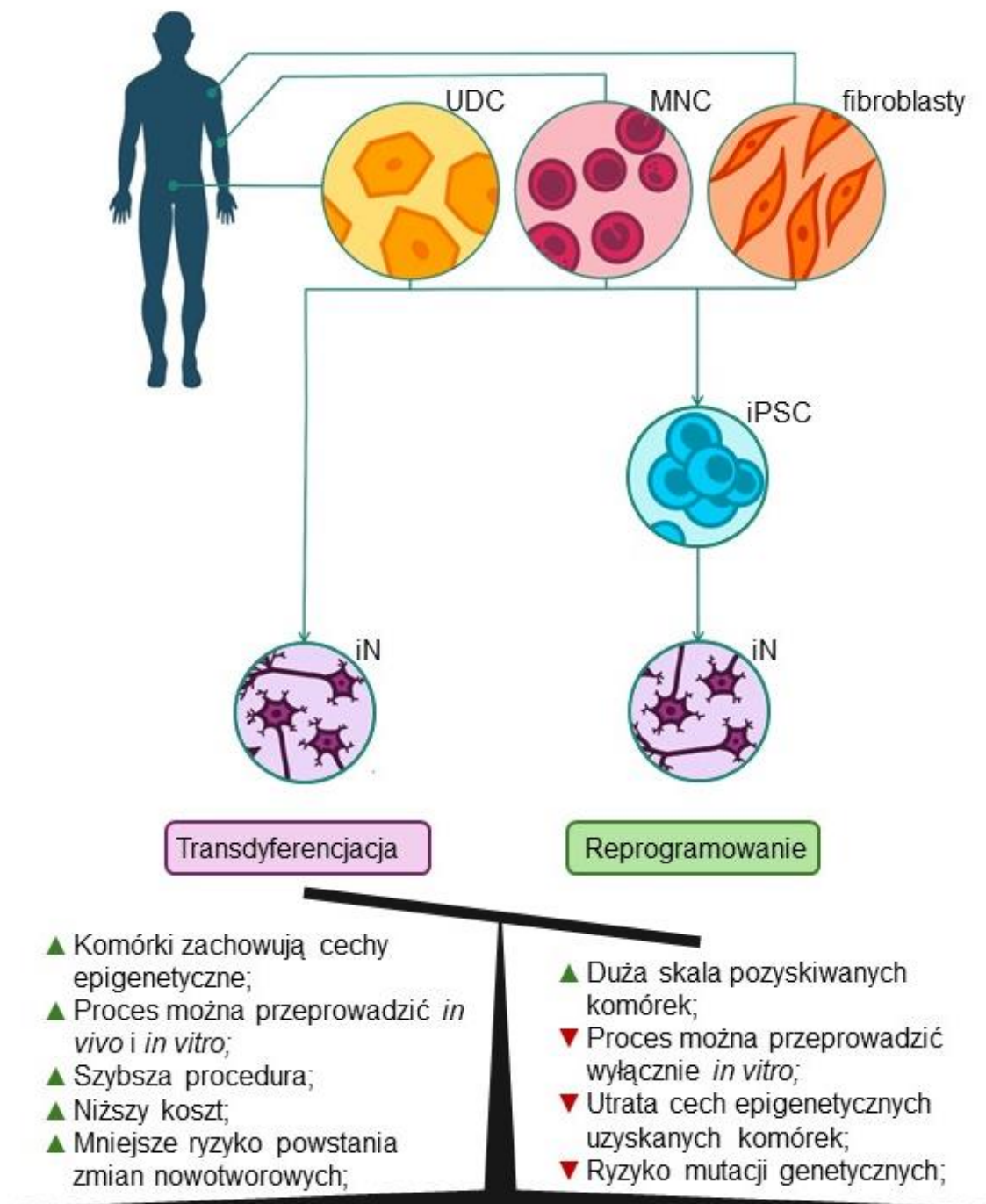
### 1.1. Transdyferencjacja i reprogramowanie

Wszystkie rodzaje komórek obecne w dorosłym organizmie są definiowane na etapie rozwoju przez czynniki transkrypcyjne, odpowiedzialne za ekspresję genów właściwą dla poszczególnych typów komórek. Efekt działania czynników transkrypcyjnych jest wspomagany przez modyfikacje epigenetyczne [1]. Do przykładów modyfikacji epigenetycznych zalicza się m.in. metylację DNA, czyli proces przyłączenia grupy metylowej do pierścienia cytozyny w DNA przez metylotransferazę DNA. Innym przykładem są modyfikacje białek histonowych, poprzez fosforylację, ubikwitynację, acetylację lub metylacje prowadzące do rearanżacji chromatyny [2, 3].

Uważano, że charakter zróżnicowanych komórek jest niezmienny i ostateczny, jednak Yamanaka i wsp. [4] zaprezentowali technikę drastycznej zmiany losu komórek somatycznych. Stosując egzogenne czynniki transkrypcyjne wywołali w fibroblastach pluripotencje, czyli możliwość różnicowania w inny typ komórek somatycznych. Ich praca zainspirowała kolejnych badaczy do pogłębienia tematu zmiany losu komórek *in vitro*, i tak w 2010r Vierbuchen i wsp. [1] przeprowadzili pierwsze bezpośrednie przekształcenie fibroblastów w funkcjonalne neurony. Cel uzyskali poprzez zastosowanie trzech czynników transkrypcyjnych: ASCL1, BRN2 i MYT1, które kolektywnie nazwano BAM. Przeprowadzony proces określono mianem transdyferencjacji (inaczej nazywanej transróżnicowaniem), czyli bezpośrednim przekształceniem już zróżnicowanych komórek w inny typ komórek [5]. Opracowana technika dała początek kolejnym badaniom, których przykładem może być praca Pfisterer i wsp. [6], w której pozyskano neurony dopaminergiczne z fibroblastów z zastosowaniem BAM w połączeniu z Lmx1a i FoxA2. Inny zespół badaczy [7] wykazał również, że BAM umożliwia pozyskanie funkcjonalnych neuronów z ludzkich pluripotencjalnych komórek macierzystych (PSC – ang. *pluripotent stem cells*). Należy jednak zwrócić uwagę, że przeprowadzona przez nich procedura nie była procesem transróżnicowania tylko różnicowania, ponieważ komórkami wyjściowymi były PSC. Innym odkrytym procesem przekształcania komórek somatycznych jest reprogramowanie, które zachodzi z etapem wytworzenia komórek iPSC (iPSC – ang. *induced pluripotent stem cells*) (Ryc. 1). Zaletą reprogramowania jest duża skala, na jaką mogą zostać wytwarzane komórki docelowe dzięki zdolności iPSC do samoodnawiania, jednak transdyferencjacja wykazuje znacznie większy wachlarz zalet.



Ze względu na brak etapu wytworzenia iPSC, transróżnicowanie jest procesem szybszym, wymagającym mniejszych nakładów finansowych i wykazującym lepszą skuteczność. Dodatkowo transróżnicowanie umożliwia zachowanie epigenetycznych cech komórek, czego nie zaobserwowano dla komórek uzyskanych w wyniku reprogramowania. W związku z tym komórki uzyskane w wyniku transdyferencji mogą być wykorzystywane do modelowania chorób związanych z określonym epigenomem [8].



Ryc. 1. Transdyferencja i reprogramowanie, wg [8–11]

## 1.2. Rodzaje komórek wyjściowych stosowanych w procedurze transdiferencjacji neuronalnej

Metodyki transdiferencjacji opracowano dla różnych rodzajów komórek somatycznych, jednak jednymi z pierwszych komórek, które przekształcono w neurony były astrocyty. Stanowią większość komórek w centralnym układzie nerwowym i w przeciwieństwie do neuronów nie przewodzą sygnałów elektrycznych [12]. Ze względu na ich pochodzenie, proces przekształcenia astrocytów w neurony jest mniej wymagający, w porównaniu do transróżnicowania fibroblastów [13]. Przykładowo, neuronalna transdiferencjacja astrocytów była osiągnięta z zastosowaniem już dwóch czynników transkrypcyjnych – NGN2 i ASCL1 (poprzednia nazwa - Mash1) [14]. W celu uzyskania ludzkich astrocytów do hodowli *in vitro*, konieczne jest wykonanie biopsji kory mózgowej pacjentów w trakcie operacji neurochirurgicznej lub pośmiertnie. Metoda jest wysoce inwazyjna, dlatego zastosowanie astrocytów w terapii personalizowanej jest znacznie ograniczone [15].

Kolejnym najczęściej wykorzystywanym typem komórek w procesie transdiferencjacji neuronalnej są fibroblasty [16–19]. W organizmie ludzkim odpowiedzialne są za budowę tkanek łącznych [20]. Fibroblasty są łatwo dostępne, jednak metoda ich izolacji od dawcy wymaga inwazyjnej i bolesnej procedury biopsji [21]. Dodatkowo zastosowanie danych komórek, wymaga wcześniejszego namnożenia, które może powodować powstanie losowych mutacji dla komórek w hodowli [22]. Ponadto wykazano, że dorosłe fibroblasty nie ulegają transróżnicowaniu, tak efektywnie jak fibroblasty płodowe [6, 7]. Opisane czynniki przekładają się na trudniejszą do opracowania procedurę transróżnicowania fibroblastów.

W celu zmniejszenia inwazyjności procedur pozyskiwania komórek wyjściowych, badacze postanowili opracować sposoby transróżnicowania neuronalnego z innych rodzajów komórek. W wyniku podjętych starań opracowano metody transdiferencjacji komórek pozyskiwanych z moczu. Izolacja komórek wyjściowych jest bezpieczna dla pacjentów i tania do przeprowadzenia. Natomiast, opracowane do tej pory metodyki wykazują efektywność transróżnicowania na poziomie 21% - 39%, dlatego wymagają dalszego udoskonalenia [23–25].

Innym alternatywnym źródłem komórek są składniki krwi, np. limfocyty T. Procedura ich izolacji jest mniej inwazyjna niż biopsja i umożliwia pozyskanie dużej ilości komórek do celów badawczych, bez dodatkowego namnażania. Wykazano, że stosując metodykę o efektywności transróżnicowania 6,2%, możliwe jest pozyskanie

>50 000 indukowanych neuronów z 1mL krwi obwodowej [22]. Kolejnym stosowanym składnikiem krwi są monocyty. Dotychczas opracowane procedury transdiferencjacji neuronalnej wykazują efektywność na poziomie 12% [26] lub 80% [27]. Wspomniane metodyki wciąż nie wyjaśniają w pełni mechanizmu transróżnicowania monocytów. Pozostawiają również pole do udoskonalenia procedury, aby uzyskiwać lepiej zdefiniowane komórki neuronalne z większą efektywnością.

### **1.3. Sposoby indukcji procesu transdiferencjacji**

Transdiferencjacja niezależnie od rodzaju komórek wyjściowych, może być indukowana kilkoma sposobami (Tab. 1). Pierwszą strategią procesu transróżnicowania było wykorzystanie czynników transkrypcyjnych, takich jak wcześniej opisanych BAM. Czynniki transkrypcyjne to białka stanowiące podstawę prawidłowego rozwoju embrionalnego, syntezy białek specyficznych dla określonych tkanek oraz odpowiedzi na sygnały szlaków komórkowych. Spełniają podane funkcje przez modulację ekspresji genów w wyniku wiązania się z regulatorowymi sekwencjami DNA [9, 10]. Istotną kwestią w procesie transdiferencjacji stanowi dobór odpowiedniej kombinacji czynników transkrypcyjnych, które będą modulować ekspresję genów regulujących różnicowanie i dojrzewanie neuronów lub innych pożądanym komórek docelowych. Przydatnym narzędziem w tym celu jest strona internetowa <https://mogriify.net>, która z zastosowaniem algorytmów sieciowych umożliwia odnalezienie czynników transkrypcyjnych, potencjalnie pozwalających przeprowadzić transróżnicowanie określonych komórek somatycznych w wybrany rodzaj komórek wyjściowych. Przykładowo, w celu przeprowadzenia transdiferencjacji fibroblastów skóry w neurony, wyszukiwarka proponuje czynniki transkrypcyjne takie jak CUX2, SOX2 i HES6 dostarczając jednocześnie powiązane artykuły naukowe dostępne w bazie PubMed. Aby wprowadzić wybrane czynniki transkrypcyjne do indukowanych komórek, stosowane są wektory wirusowe (zazwyczaj lentiwirusowe). Efektywność transdukcji wirusowej uzależniona jest od licznych czynników (np. rodzaju komórek lub warunków hodowlanych) i mieści się w granicach 4% - <100% [11, 28]. Z myślą o udoskonaleniu opisanej techniki połączono czynniki transkrypcyjne z mikroRNA lub małymi molekułami, zwiększając wydajność procedury. Pozyskiwane komórki mają jednak ograniczone zastosowanie wyłącznie do badań w warunkach *in vitro*, ze względu na ryzyko powstania mutacji genetycznych [23].

Kolejną techniką indukującą proces transdiferencjacji jest zastosowanie mikroRNA, czyli 19-22 nukleotydowych, niekodujących cząsteczek RNA. Pełnią one funkcję modulatorów ekspresji genów na poziomie post-transkrypcyjnym. W większości przypadków wiążą się z niekodującym rejonem (UTR – ang. *untranslated region*) 3' docelowego mRNA. Dodatkowo mogą wiązać się z regionem 5' UTR i sekwencjami kodującymi mRNA. Ich połączenie prowadzi do cięcia lub hamowania translacji mRNA, wywołując modyfikacje ekspresji genów. Ze względu na ich mały rozmiar, mogą być wprowadzane do wnętrza komórek bez zastosowania wektorów wirusowych, czyli stosując transfekcję. Przykładami metod transfekcji mRNA są m.in.: elektroporacja, mikroiniekcja i lipofekcja. Opisywana technika nie jest jednak pozbawiona wad, ponieważ efekt interakcji mikroRNA-mRNA wciąż pozostaje trudny do przewidzenia. Ogranicza to możliwość zastosowania mikroRNA w procedurach transdiferencjacji, do pozyskiwania komórek wyłącznie w celach badawczych *in vitro* [8, 29–31].

Alternatywną techniką, która umożliwia uniknięcie wad stosowania czynników transkrypcyjnych i mikroRNA jest procedura chemicznej transdiferencjacji z zastosowaniem małych molekuł (SM – ang. *small molecules*). Są to cząsteczki o niskiej wadze molekularnej, zdolne do regulacji procesów komórkowych [32]. Zastosowanie ich w procesie transróżnicowania niesie ze sobą wiele korzyści. Ze względu na zdolność przenikania błony komórkowej, SM nie wymagają stosowania metod transfekcji, jak w przypadku mikroRNA. Wprowadzane są do wnętrza komórek, w trakcie prowadzenia hodowli *in vitro*, jako dodatek do używanego medium. Zastosowanie SM jest tańszą alternatywą indukcji transróżnicowania, ponieważ są łatwo syntetyzowane i powszechnie dostępne. Ponadto pozwalają na opracowanie przejrzystej walidacji, dzięki możliwości dokładnego określenia stężenia, potrzebnego do uzyskania pożądanego efektu dla danego rodzaju komórek. Przyczynia się to do zwiększenia powtarzalności uzyskiwanych wyników [33]. Uwzględniając opisane czynniki, zastosowanie SM wydaje się najlepszym sposobem indukcji transdiferencjacji, dlatego można zaobserwować wzrastającą ilość badań poświęconych wspomnianej technice.

**Tab. 1. Przegląd metod transdiferencjacji neuronalnej**

<b>Komórki wyjściowe</b>	<b>Czynniki indukujące transdiferencjacje</b>	<b>Uzyskane komórki</b>	<b>Ref.</b>
Astrocyty	TF: NURR1, SHh, BCLxL, ASCL1, ASCL1-5SA	Neurony dopaminergiczne	[34]
Fibroblasty	TF: NKX2.2, FEV, GATA2, LMX1B, ASCL1, NGN2	Neurony serotonergiczne	[35]
Fibroblasty	TF: MYT1L i BRN2 mikroRNA: miR-124	Neurony	[17]
Fibroblasty	TF: ASCL1 SM: forskolina	Neurony	[36]
Komórki nabłonka barwnikowego siatkówki	TF: ASCL1 mikroRNA: miR-124	Neurony	[37]
Fibroblasty	mikroRNA: miR-9/9 i miR-124	Neurony	[38]
Fibroblasty	mikroRNA: miR-124	Neurony	[39]
Fibroblasty	mikroRNA: miR-9/9 i miR-124	Neurony	[40]
Astrocyty	SM: chir99021, DAPT, LDN-193189, SB-431542	Neurony	[41]
Astrocyty	SM: kwas walproinowy, chir99021, RepSox, forskolina, I-Bet151, ISX-9	Komórki neuronalne	[42]
Astrocyty	SM: kenpaullone, forskolina, Y-27632, purmorfamina, kwas retinowy	Neurony ruchowe	[43]
Fibroblasty	SM: kwas walproinowy, RepSox, kenpaullone, forskolina, Y-27632, purmorfamina	Neurony dopaminergiczne	[44]
Fibroblasty	SM: forskolina, RepSox, SP600125, chir99021, Go6983, Y-27632, ISX-9, I-BET151	Neurony	[45]
Komórki zebrane z moczu	SM: chir99021, A83-01, Y-27632, TTNPB, forskolina, kwas walproinowy, NaB	Komórki neuronalne	[24]

#### 1.4. Mechanizm procesu chemicznej transdyferencji neuronalnej

Proces transdyferencji wymaga jednoczesnej aktywacji programów transkrypcyjnych docelowego typu komórek oraz wyciszenie programów transkrypcyjnych komórek wyjściowych. W przypadku transdyferencji neuronalnej aktywowane będą szlaki odpowiedzialne za neuronalny charakter komórek, a wyciszane te, które pierwotnie zdecydowały o losie komórek wyjściowych [46]. Pomimo wielu badań poświęconych technice transróżnicowania neuronalnego, mechanizm transdyferencji wciąż pozostaje niewyjaśniony w pełni i wymaga lepszego zrozumienia.

Dotychczas wyróżniono kilka szlaków, które wydają się odgrywać kluczową rolę w transdyferencji neuronalnej. Jednym z najlepiej opisanych jest szlak transformującego czynnika wzrostu- $\beta$  (TGF- $\beta$  – ang. *transforming growth factor- $\beta$* ), który odgrywa rolę m.in. w embriogenezie, czy też w regeneracji i naprawie tkankowej, poprzez indukcję przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego [47]. W procesie transróżnicowania inhibicja TGF- $\beta$  blokuje fosforylację białek SMAD, prowadząc do aktywacji szlaku WNT i RAR, wywołując tym modyfikacje w ekspresji genów kluczowych dla procesu neurogenety [48]. Ponadto wywołana inhibicja może prowadzić do zablokowania fosforylacji Rhoa, zmniejszając aktywność kolejnego istotnego szlaku, tj. szlak kinazy zależnej od Rho (ROCK – ang. *Rho-associated coiled-coil containing kinase*) [49]. Następnym istotnym czynnikiem w procesie wytwarzania komórek neuronalnych jest cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan (cAMP – ang. *cyclic adenosine monophosphate*), którego aktywacja wpływa pozytywnie na proces różnicowania, dojrzewania i przeżywalności neuronów. Wykazano m.in., że zwiększony poziom cAMP powoduje wzrost ekspresji PKA/CREB1, powodując inhibicję szlaku JNK, regulującego apoptozę neuronów. Ponadto cAMP może pośrednio prowadzić do aktywacji genów związanych z embriogenezą neuronalną, takich jak ASPM i KIF20B [22, 50].

W celu przeprowadzenia transdyferencji neuronalnej badacze wykorzystują SM, które mogą modulować poszczególne szlaki, np.: aktywatory szlaku WNT, cAMP, RAR oraz inhibitory TGF- $\beta$ , ROCK czy HDAC.

### 1.4.1. Mechanizm działania wybranych małych molekuł stosowanych w procesie transdiferencjacji neuronalnej

Badania poświęcone opracowaniu optymalnej procedury chemicznej transdiferencjacji neuronalnej są dynamicznie rozwijającym się obszarem nauki. Opracowano liczne metodyki transróżnicowania neuronalnego z wykorzystaniem różnorodnych SM. Do powszechnie stosowanych można zaliczyć chir99021, RepSox, Y-27632, forskolinę, dorsomorfinę, kwas walproinowy czy też TTNPB.

**Chir99021** jest jedną z najczęściej stosowanych SM w różnicowaniu iPSC i transdiferencjacji neuronalnej astrocytów czy też fibroblastów [51]. Mechanizm działania chir99021 opiera się na bezpośredniej inhibicji GSK3 $\beta$ . Zainicjowany w ten sposób proces prowadzi do zablokowania degradacji  $\beta$ -ketaniny (proces w normalnych warunkach jest aktywowany przez GSK3 $\beta$ ), prowadząc do aktywacji szlaku sygnałowego WNT [24, 52]. Istotny wpływ wspomnianej SM na proces transróżnicowania neuronalnego zaobserwował Gao i wsp. [42], którzy eliminując chir99021 i RepSox (inhibitor TGF- $\beta$ ) nie uzyskali różnicowania neuronalnego.

Innym przykładem SM, pośrednio aktywującej szlak WNT, jest **RepSox**. Wywołuje inhibicję ALK5, następnie blokując szlak TGF- $\beta$  [42, 53]. Inhibicja TGF- $\beta$  powoduje kolejno inhibicję SMAD, przyczyniając się pośrednio do aktywacji szlaku WNT i RAR (Ryc. 2) [48].

**Y-27632** jest dobrze poznanym inhibitorem szlaku ROCK, prowadzącym w kontekście neurogenezy do przebudowy cytoszkieletu komórek, czyniąc go bardziej elastycznym. Umożliwia tym samym aksonogenezę, czyli wydłużenie i rozgałęzienie aksonów [24, 54, 55].

**Forskolina** jest cząsteczką powszechnie stosowaną w celu redukcji tkanki tłuszczowej, poprzez podnoszenie poziomu cAMP. Efekt jest uzyskiwany w wyniku aktywacji enzymu cyklazy adenylanowej (AC – ang. *adenylate cyclase*), która generuje cAMP z adenylozotrójfosforanu (ATP). Zwiększony poziom cAMP w procesie transdiferencjacji neuronalnej prowadzi do aktywacji szlaku PKA/CREB1 i następnie inhibicji szlaku JNK, zwiększając efektywność transróżnicowania [50]. Forskolina dodatkowo obniża poziom NRSF (ang. *neuron restrictive silencer factor*), który wykazuje ekspresję w komórkach nieneuronalnych. Jego inhibicja indukuje ekspresję genów neuronalnych, prowadząc do przekształcenia komórek w kierunku neuronalnym [56].

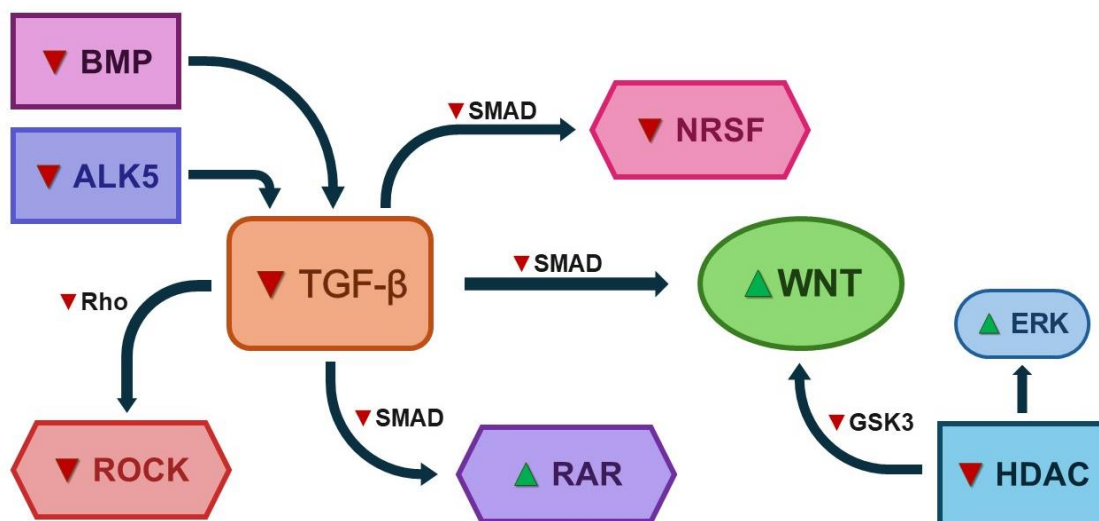
**Dorsomorfina** jest inhibitorem szlaku białek morfogenetycznych kości (BMP – ang. *bone morphogenetic protein*) [22]. Wspomniany szlak składa się z grupy sygnałowych cząsteczek należących do rodziny białek TGF- $\beta$ . Początkowo szlak BMP był znany z indukcji formowania kości. Badania wykazały, że odgrywa również istotną rolę w innych procesach embriogenetycznych, w procesach rozwojowych komórek (np., w różnicowaniu i apoptozie) oraz w utrzymywaniu prawidłowej homeostazy dojrzałych tkanek [57–65]. Wykazano, że inhibicja BMP na wczesnym etapie neurogenezy umożliwia utworzenie neuroektodermy. Natomiast na późniejszych etapach transdiferencjacji potrzebne są wyższe poziomy sygnalizacji BMP, w celu migracji komórek nerwowych i utworzenia grzebienia nerwowego [66, 67].

Kolejną SM, przykuwającą uwagę badaczy jest **kwasy walproinowy** (VPA – ang. *valproic acid*), który klinicznie stosowany jest w stabilizacji nastroju. Wykazano, że wywołuje inhibicję deacetylazy histonowej (HDAC – ang. *histone deacetylase*), która jest modulatorem epigenetycznym sygnalizacji jądrowej i cytoplazmatycznej [68]. Dodatkowo stwierdzono, że VPA zmniejsza poziom GSK3, tym samym przyczyniając się do aktywacji szlaku WNT [47, 69]. VPA stymuluje neurogenezę również poprzez aktywację szlaku kinazy ERK (ang. *extracellular signal-regulated kinase*), który jest zaangażowany w proces wzrostu neurytów i przeżywalności neuronów [70].

Obserwując objawy neurologiczne wywołane niedoborem witaminy A i jej metabolitu - kwasu retinoidowego (RA – ang. *retinoic acid*), stwierdzono istotność szlaku receptorów kwasu retinoidowego (RAR – ang. *retinoic acid receptors*) w procesie neurogenezy [48, 71]. RA umożliwia aktywację ekspresji genu Neurogenin 2, stymulując proces neurogenezy [71, 72]. **TTNPB** jest stabilnym w formie analogiem RA, zdolnym do bezpośredniej aktywacji RAR, który wywiera stymulujący wpływ na proces transróżnicowania neuronalnego podobnie do RA [24, 73].

Opisane SM oddziałują na najlepiej poznane szlaki zaangażowane w proces neurogenezy. Część z nich wykazuje również działanie protekcyjne i jest używana aby utrzymać przy życiu jak największą ilość komórek. Mechanizm działania i interakcji SM dotychczas nie został w pełni poznany, dlatego dobranie odpowiedniego koktajlu wciąż pozostaje wyzwaniem.





**Ryc. 2. Interakcje wybranych szlaków uczestniczących w procesie transdiferencjacji neuronalnej, opracowanie własne**

▼ - inhibicja danego szlaku; ▲ – aktywacja określonego szlaku; Inhibicja BMP czy ALK5 mogą prowadzić do zahamowania aktywności TGF- $\beta$ , powodując inhibicję SMAD prowadząc tym samym do zwiększenia aktywności szlaku RAR i WNT oraz zmniejszenia aktywności NRSF. Ponadto inhibicja TGF- $\beta$  przyczynia się do inhibicji ROCK przez zmniejszenie ilości Rho. Szlak WNT może być również pośrednio aktywowany przez inhibicję GSK3 wywołaną zmniejszeniem aktywności HDAC, która dodatkowo inicjuje aktywność ERK;

### 1.5. Zastosowania dla procesu transdiferencjacji w neurologii

Zaburzenia neurologiczne stanowią trzecią najczęstszą przyczynę niepełnosprawności i przedwczesnej śmierci w Unii Europejskiej [74]. W związku z powyższym, neurologia wymaga szczególnej uwagi badaczy, aby opracować nowe strategie terapeutyczne. Pomimo wieloletnich badań dla większości chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona czy Huntingtona, powodujących zaburzenia funkcji poznawczych pacjentów, mechanizm działania nadal nie jest dobrze poznany. Dodatkowo opracowane leczenie jest jedynie objawowe i opóźnia utratę neuronów [75, 76]. Trudność w tworzeniu modeli badawczych i strategii terapeutycznych dla neuronalnych jednostek chorobowych wynika m.in. z braku zdolności regeneracyjnych komórek neuronalnych, których uszkodzenie lub utrata jest nieodwracalna [52]. W odpowiedzi na opisany problem naukowcy próbują opracować techniki opierające się na uzupełnieniu brakujących komórek neuronalnych, komórkami macierzystymi różnego pochodzenia [77–82]. Metoda obarczona jest wadami, które ograniczają jej zastosowanie w warunkach klinicznych. Jednym z ograniczeń jest trudność pozyskiwania i izolacji komórek macierzystych oraz wysoki koszt procedury. Kolejnym aspektem jest bezpieczeństwo wszczepienia komórek macierzystych. Zastosowanie ich u pacjentów niesie ryzyko powstania stanów zapalnych, czy też

zachodzenia procesu nowotworzenia [75, 83, 84]. Inną strategią na przezwycięzenie opisanych trudności wydaje się wykorzystanie neuronalnej transdiferencjacji. Proces pozwala uzyskać komórki neuronalne z łatwiejszych do pozyskania komórek somatycznych np. fibroblastów [85]. Uzyskane w ten sposób komórki mogą zostać wykorzystane do modelowania chorób, w testach cytotoksyczności neuronalnych wyrobów farmaceutycznych oraz jako bezpośredni materiał w terapii komórkowej, aby zastąpić komórki uszkodzone lub brakujące [86].

Jednym z podstawowych narzędzi umożliwiających lepsze zrozumienie mechanizmu choroby są modele komórkowe i zwierzęce. Ze względu na trudną dostępność komórek neuronalnych, badania poświęcone chorobom neurodegeneracyjnym dotychczas opierały się głównie na modelach zwierzęcych. Metoda nie odzwierciedla choroby występującej u człowieka, z powodu różnic w podłożu genetycznym, anatomii mózgu i procesów biologicznych takich jak starzenie. Wykazano, np. że modele myszy z Alzheimerem nie odzwierciedlają wielu patologicznych zmian takich jak utrata neuronów, która obserwowana jest u ludzi [76]. W celu poprawy modeli chorób neuronalnych naukowcy zaczęli opracowywać techniki uzyskiwania neuronów z cechami charakterystycznymi dla określonych jednostek chorobowych z zastosowaniem transdiferencjacji. Przykładem może być praca Hu i wsp. [85], którzy przeprowadzili transdiferencjację fibroblastów pozyskanych od pacjentów z rodzinną chorobą Alzheimera z mutacją *APPV717I*, w komórki neuronalne. Uzyskane przez nich komórki wykazywały zwiększony poziom  $A\beta_{42}$  i proporcje  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ , które wywoływane są przez mutację *APPV717I*, potwierdzając zachowanie cech komórek wyjściowych. Inną jednostką chorobową, dla której udało się uzyskać model komórkowy wykorzystując transdiferencjowanie jest choroba Huntingtona. Charakteryzuje się ona utratą średnich kolczystych neuronów GABA-ergicznymi, powodując tym samym postępujące objawy motoryczne i psychiatryczne u pacjentów [87]. Choroba jest nieuleczalna, dlatego praca Liu i wsp. [88], w której z fibroblastów pacjentów pozyskano komórki neuronalne zachowujące cechy neuropatologiczne choroby Huntingtona, jest niezwykle istotna dla dalszych badań nad mechanizmem i środkami terapeutycznymi. Kolejnym przykładem jest model dla choroby Krabbe, wywołwanej defektem  $\beta$ -galaktozyloceramidazy – enzymu rozkładającego m.in. psychosynę, której nagromadzenie powoduje dysfunkcję komórek glejowych mielinotwórczych. Lim i wsp. [89] opracowali metodę transdiferencjacji fibroblastów, w wyniku której pozyskali komórki neuronalne,

wykazujące defekt aktywności  $\beta$ -galaktozyloceramidazy. Następnym przykładem może być model komórkowy stwardnienia zanikowego bocznego (ALS – ang. *amyotrophic lateral sclerosis*), który został uzyskany przez Liu i wsp. [90] poprzez transdiferencjację fibroblastów pacjentów w komórki neuronalne wykazujące patologiczne cechy chorobowe. Biorąc pod uwagę, że dla ALS wciąż brakuje skutecznego leczenia, a mechanizmy powodujące uszkodzenia i śmierć neuronów ruchowych pozostaje niezrozumiały, opracowanie dobrego modelu komórkowego choroby niesie za sobą szereg korzyści. Zaprezentowane przykłady pozyskiwania modeli komórkowych chorób neurodegeneracyjnych ukazują pierwsze sposoby wykorzystania wiedzy o procesie transdiferencjacji w praktyce i prezentują istotny wpływ tej procedury na rozwój neurologii.

## **2. Cel pracy**

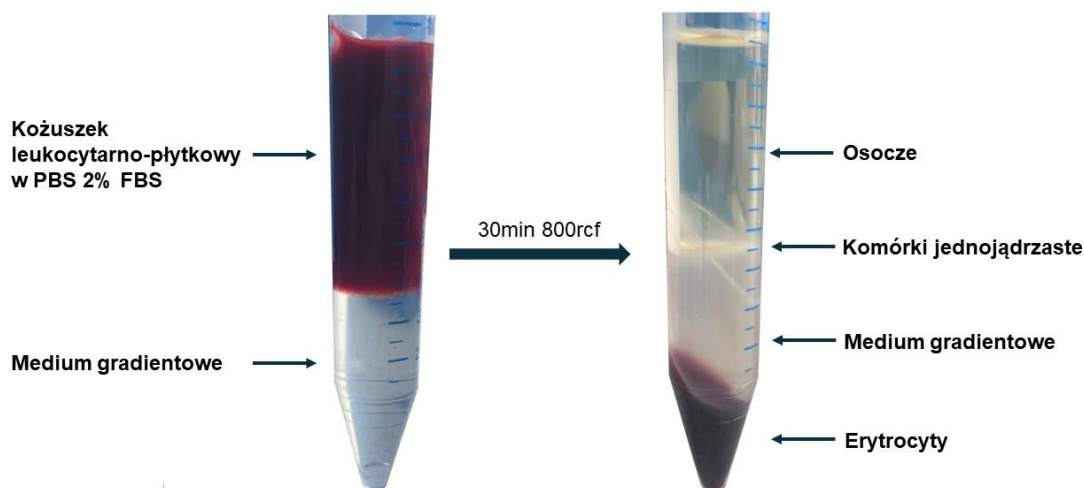
Celem niniejszej pracy było porównanie wydajności, kosztów i czasu potrzebnego do przeprowadzenia chemicznej transdyferencji monocytów w neurony oraz opracowanie w ten sposób najbardziej optymalnej procedury.

### 3. Materiały i metody

#### 3.1. Izolacja monocytów

##### 3.1.1. Izolacja monocytów z kożuszków leukocytno-platek

Kożuszki leukocytno-platekowe zostały zakupione z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Szczecinie i poddane procedurze izolacji bezpośrednio po przewiezieniu do laboratorium. Przeprowadzono izolację z 13 kożuszków leukocytno-platekowych uzyskanych od różnych pacjentów. W pierwszym etapie rozcieńczono kożuszek z roztworem soli fizjologicznej (PBS – ang. *phosphate buffered saline*) wzbogaconej 2% płodowej surowicy bydlęcej (FBS – ang. *fetal bovine serum*) w proporcji 1:2. Następnie mieszaninę naniesiono na powierzchnię medium gradientowego Lymphoprep (StemCell Technologies, nr kat.: 07851), tak aby nie doszło do zmieszania się z odczynnikami. Przygotowany kożuszek zwirowano 30 min w 800 rcf w temperaturze pokojowej. Rozdzieloną warstwę komórek jednojądrzastych (Ryc. 3) przełożono do nowego flakonu i przepłukano trzykrotnie PBS 2% FBS. Po ostatnim etapie płukania, komórki zawieszono w 1 mL buforu EasySep Buffer (StemCell Technologies, nr kat.: 20144). W następujących etapach izolacji monocytów stosowano zestaw do izolacji EasySep (StemCell Technologies, nr kat.: 19359) wykorzystujący immunomagnetyczną selekcję negatywną. Umożliwia on pozyskanie populacji komórek CD14<sup>+</sup> i CD16<sup>-</sup> (monocyty klasyczne). Do zawiesiny komórek dodano 50 µL odczynnika Isolation Cocktail i odczynnika Platelet Removal Cocktail. Mieszaninę zworteksowano i inkubowano 5 min. Następnie dodano 50 µL zawiesiny kuleczek magnetycznych i powtórzono 5 min inkubację, po której dodano 1,5 mL bufora EasySep Buffer. Tak przygotowaną zawiesinę komórek i kuleczek magnetycznych umieszczono w statywie magnetycznym na 2,5 min. Po upływie czasu inkubacji zawiesinę monocytów przelano do nowej próbki. Ilość wyizolowanych komórek określono poprzez wybarwienie monocytów odczynnikami Turka i zliczenie komórek umieszczonych w hemocytometry. W celu określenia czystości wyizolowanej populacji monocytów pobrano próbkę do analizy z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Pozostałe komórki zamrożono, poprzez stopniowe zmniejszanie temperatury z -20°C do -80°C i po 24 h umieszczenie w ciekłym azocie.



**Ryc. 3. Rozdzielenie kożuszka leukocytarno-płytkowego na poszczególne składniki**

### 3.1.2. Określenie czystości populacji wyizolowanych monocytów

W celu określenia czystości wyizolowanej populacji monocytów, zastosowano analizę cytometryczną. Procedurę rozpoczęto od sporządzenia mieszaniny następujących przeciwciał znakowanych następującymi fluorochromami: anty – CD14 APC-H7, anty – CD45 V500-C i anty – CD16 FITC. Mieszaninę połączono z 30  $\mu$ L zawiesiny komórek, zworteksowano i inkubowano 20 min w temperaturze pokojowej, w ciemności. Następnie, aby usunąć niezwiązane przeciwciała, dodano bufor CellWASH (Becton Dickinson, nr kat.: 349524) i odwirowano 10 min w 550 rpm. Uzyskany osad komórkowy zawieszono w 350  $\mu$ L buforu FACSFlow (Becton Dickinson, nr kat.: 342003). Tak przygotowaną próbkę analizowano z zastosowaniem cytometru przepływowego BD FACS Canto II firmy BD Biosciences. Uzyskane dane poddano analizie z użyciem programu Infinicyt 2.0 (Cytognos, Rotterdam, Holandia).

## 3.2. Hodowle komórkowe

### 3.2.1. Hodowla komórek SH-SY5Y

Linia komórkowa SH-SY5Y (kontrola pozytywna) była podarunkiem od szanownego kierownika Zakładu Patologii PUM prof. Bogusława Machalińskiego. Komórki hodowano w zależności od przeznaczenia w butelkach 75cm<sup>2</sup> w celu izolacji RNA lub w 8-komorowych szkiełkach podstawowych (ang. - *8-well chamber slide*) do barwienia immunofluorescencyjnego (Ryc. S1). Stosowane medium hodowlane składało się z medium DMEM:F12 (Gibco, nr kat.: 11320033) wzbogaconego 10% FBS i 1% koktajlu antybiotyków Antibiotic-Antimycotic (AA, Gibco, nr kat.: 15240-062).

Linia komórkowa była inkubowana w 37°C 5% CO<sub>2</sub>, z codzienną obserwacją morfologii oraz wymianą medium na świeżą porcję co 3 dni.

### **3.2.2. Przygotowanie naczyń hodowlanych do wysiewu monocytów**

W celu wysiania monocytów naczynia hodowlane należało pokryć warstwą poli-D-lizyny, rozpoczynając od przygotowania mieszaniny roboczej o stężeniu 50 µg/mL. Następnie każdą komorę 8-komorowego szkiełka podstawowego zalano 0,3 mL roztworu i inkubowano 1 h w temperaturze pokojowej. Komory przepłukano trzykrotnie PBS i pozostawiono do wyschnięcia 2 h. Tak przygotowane 8-komorowe szkiełka podstawowe zabezpieczono folią uszczelniającą i przechowywano w lodówce do momentu wysiewu komórek.

### **3.2.3. Wysiew monocytów**

Monocyty zostały rozmrożone poprzez zalanie ich medium X-VIVO 15 (Lonza, nr kat.: 02-060Q) podgrzanym do temperatury 37°C. Przygotowaną zawiesinę odwirowano (5 min 300 rcf) i usunięto supernatant aby wyeliminować dimetylosulfotlenek (DMSO), który był obecny w medium stosowanym na etapie mrożenia komórek. Następnie monocyty ponownie zawieszono w medium X-VIVO 15 i rozdzielono do wcześniej przygotowanych 8-komorowych szkiełek podstawowych w zagęszczeniu 180 000 komórek/cm<sup>2</sup> w trzech powtórzeniach do izolacji RNA oraz na każde analizowane przeciwciało. Komórki inkubowano 1 h w 37°C 5% CO<sub>2</sub>, po czym medium zostało wymienione na medium indukujące transróżnicowanie, którego skład był dostosowany do przeprowadzanej metodyki transdyferencji.

### **3.2.4. Transdyferencjacja z zastosowaniem metodyki 1**

Proces transdyferencji rozpoczęto od wymiany medium X-VIVO 15 na medium indukujące I (MI I) (Ryc. 4), które składało się z X-VIVO 15 wzbogaconego czynnikami neurotroficznymi, czynnikiem stymulującym tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF – ang. *macrophage colony-stimulating factor*, Gibco, nr kat.: PHC9504), insulinopodobnym czynnikiem wzrostu 1 (IGF – ang. *insulin like growth factor*, StemCell Technologies, nr kat.: 78022.1), GlutaMAX (Gibco, nr kat.: 35050-061), AA i wybranym koktajlem SM: chir99021, RepSox, forskolina, dorsomorfina, Y-27632, kwas walproinowy (Tab. 2). Komórki indukowano 6 dni, z wymianą medium na świeżą porcję po 3 dniach. Następnie medium zostało wymienione na medium dojrzewające I (MD I), składające się z mieszanki mediów DMEM:F12 i Neurobasal

(Gibco, nr kat.: 21103049) w proporcji 1:1, suplementowane czynnikami neurotroficznymi, IGF, GlutaMAX, AA i koktajlem SM, w którym kwas walproinowy został zastąpiony witaminą C. Inkubacja komórek w MD I trwała 10 dni z połowiczną wymianą medium na świeżą porcję co 2 dni. Po etapie dojrzewania uzyskane komórki indukowane metodyką 1 (KIM 1) były podtrzymywane w hodowli w medium neuronalnym (MN), składającym się z mieszanki DMEM:F12 i Neurobasal w proporcji 1:1, czynników neurotroficznymi i AA, pozbawionym dodatku SM przez 7 dni.



**Ryc. 4. Schemat transdiferencjacji neuronalnej z zastosowaniem metodyki 1**

\*Analiza obejmowała ocenę komórek na wskazanym etapie z zastosowaniem metody RT-qPCR i barwienia IF;

**Tab. 2. Skład mediów hodowlanych stosowanych w metodyce 1**

Składnik	Stężenie	Składnik	Stężenie	Składnik	Stężenie
Medium Indukujące I		Medium Dojrzewające I		Medium Neuronalne	
B27	2 %	B27	2 %	B27	2 %
N-2	1 %	N-2	1 %	N-2	1 %
BDNF	20 ng/mL	BDNF	20 ng/mL	BDNF	20 ng/mL
GDNF	20 ng/mL	GDNF	20 ng/mL	GDNF	20 ng/mL
NT3	10 ng/mL	NT3	10 ng/mL	NT3	10 ng/mL
IGF	20 ng/mL	IGF	20 ng/mL	AA	1 %
M-CSF	50 ng/mL	GlutaMAX	1 %	DMEM:F12	-
GlutaMAX	1 %	AA	1 %	Neurobasal	-
AA	1 %	Chir99021	3 $\mu$ M		
Chir99021	3 $\mu$ M	RepSox	1 $\mu$ M		
RepSox	1 $\mu$ M	Forskolina	10 $\mu$ M		
Forskolina	10 $\mu$ M	Dorsomorfina	1 $\mu$ M		
Dorsomorfina	1 $\mu$ M	Y-27632	10 $\mu$ M		
Y-27632	10 $\mu$ M	Witamina C	0,2 mM		
Kwas walproinowy	0,5 mM	DMEM:F12	-		
X-VIVO 15	-	Neurobasal	-		

\*B27 (Gibco, nr kat.: 17504044), N-2 (Gibco, nr kat.: 17502048), BDNF – czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (ang. *brain derived neurotrophic factor*, StemCell Technologies, nr kat.: 78005), GDNF – czynnik neurotroficzny pochodzący z linii komórek glejowych (ang. *glial cell line derived neurotrophic factor*, StemCell Technologies, nr kat.: 78058), NT3 – neurotrofina-3 (StemCell Technologies, nr kat.: 78074);



### 3.2.5. Transdyferencjacja z zastosowaniem metodyki 2

W celu indukcji procesu transdyferencjacji wymieniono medium X-VIVO 15 na medium indukujące I (Ryc. 5), opisane w poprzednim rozdziale. Etap indukcji trwał 6 dni i medium zostało wymienione na świeżą porcję trzeciego dnia. Proces dojrzewania komórek zainicjowano poprzez wymianę MI I na medium dojrzewające II, składające się z mieszanki DMEM:F12 i Neurobasal w proporcji 1:1 wzbogaconej czynnikami neurotroficznymi, IGF, GlutaMAX, AA oraz następującymi SM: chir99021, forskolina, dorsomorfina (Tab. 3). Komórki inkubowano w MD II 10 dni z połowiczną wymianą na świeżą porcję co 2 dni. Następnie uzyskane komórki (KIM 2 – komórki indukowane metodyką 2) podtrzymywano w hodowli w medium neuronalnym przez 7 dni.



**Ryc. 5. Schemat transdyferencjacji neuronalnej z zastosowaniem metodyki 2**

\*Analiza obejmowała ocenę komórek na wskazanym etapie z zastosowaniem metody RT-qPCR i barwienia IF;

**Tab. 3. Skład mediów hodowlanych stosowanych w metodyce 2**

Składnik	Stężenie	Składnik	Stężenie	Składnik	Stężenie
Medium Indukujące I		Medium Dojrzewające II		Medium Neuronalne	
B27	2 %	B27	2 %	B27	2 %
N-2	1 %	N-2	1 %	N-2	1 %
BDNF	20 ng/mL	BDNF	20 ng/mL	BDNF	20 ng/mL
GDNF	20 ng/mL	GDNF	20 ng/mL	GDNF	20 ng/mL
NT3	10 ng/mL	NT3	10 ng/mL	NT3	10 ng/mL
IGF	20 ng/mL	IGF	20 ng/mL	AA	1 %
M-CSF	50 ng/mL	GlutaMAX	1 %	DMEM:F12	-
GlutaMAX	1 %	AA	1 %	Neurobasal	-
AA	1 %	Chir99021	3 μM		
Chir99021	3 μM	Forskolina	10 μM		
RepSox	1 μM	Dorsomorfina	1 μM		
Forskolina	10 μM	DMEM:F12	-		
Dorsomorfina	1 μM	Neurobasal	-		
Y-27632	10 μM				
Kwas walproinowy	0,5 mM				
X-VIVO 15	-				

### 3.2.6. Transdyferencjacja z zastosowaniem metodyki 3

Inicjację procesu transdyferencjacji rozpoczęto od wymiany medium X-VIVO 15 na medium indukujące II (MI II) (Ryc. 6), składającego się z X-VIVO 15 wzbogaconego czynnikami neurotroficznymi, suplementami oraz wybranymi SM: chir99021, forskolina, Y-27632, kwas walproinowy, A83-01, TTNPB i maślan sodu (NaB) (Tab. 4). Komórki inkubowano w MI II 7 dni, z wymianą medium na świeżą porcję co 2 dni. Następnie zastosowano medium dojrzewające III (MD III), które składało się z mieszanki DMEM:F12 i Neurobasal w proporcji 1:1, z dodatkiem czynników neurotroficznych, suplementów, AA i następujących SM: Chir99021, Forskolina, Y-27632, A83-01, TTNPB, witamina C. Hodowle w MD III prowadzono 10 dni z połowiczną wymianą na świeżą porcję co 2 dni. Uzyskane komórki (KIM 3 – komórki indukowane metodyką 3) utrzymywano w hodowli w medium neuronalnym przez następnych 7 dni.



**Ryc. 6. Schemat transdyferencjacji neuronalnej z zastosowaniem metodyki 3**

\*Analiza obejmowała ocenę komórek na wskazanym etapie z zastosowaniem metody RT-qPCR i barwienia IF;

**Tab. 4. Skład mediów hodowlanych stosowanych w metodyce 3**

Składnik	Stężenie	Składnik	Stężenie	Składnik	Stężenie
<b>Medium Indukujące II</b>		<b>Medium Dojrzewające III</b>		<b>Medium Neuronalne</b>	
B27	2 %	B27	2 %	B27	2 %
N-2	1 %	N-2	1 %	N-2	1 %
BDNF	20 ng/mL	BDNF	20 ng/mL	BDNF	20 ng/mL
GDNF	20 ng/mL	GDNF	20 ng/mL	GDNF	20 ng/mL
NT3	10 ng/mL	NT3	10 ng/mL	NT3	10 ng/mL
IGF	20 ng/mL	AA	1 %	AA	1 %
M-CSF	50 ng/mL	cAMP	20 ng/mL	DMEM:F12	-
GlutaMAX	1 %	Chir99021	3 μM	Neurobasal	-
AA	1 %	Forskolina	10 μM		
Chir99021	3 μM	Y-27632	10 μM		
Forskolina	10 μM	A83-01	5 μM		
Y-27632	10 μM	TTNPB	1 μM		
Kwas walproinowy	0,5 mM	Witamina C	0,2 mM		
A83-01	0,5 μM	DMEM:F12	-		
TTNPB	1 μM	Neurobasal	-		
NaB	0,1 mM				
X-VIVO 15	-				

### 3.2.7. Transdyferencjacja z zastosowaniem metodyki 4

Transdyferencjację z zastosowaniem metodyki 4 (Ryc. 7) rozpoczęto od wymiany medium X-VIVO 15 na indukujące medium II, którego skład został opisany w poprzednim rozdziale. Indukcja komórek trwała 7 dni, z wymianą medium na świeżą porcję co 2 dni. W celu przeprowadzenia procesu dojrzewania komórek, poddano je hodowli w medium dojrzewającym II (opisanym w rozdziale 3.2.5.) przez 10 dni, z co dwudniową połowiczną wymianą medium na świeżą porcję. Uzyskane w ten sposób komórki (KIM 4 – komórki indukowane metodyką 4) inkubowano w medium neuronalnym, pozbawionym dodatku SM przez następnych 7 dni.

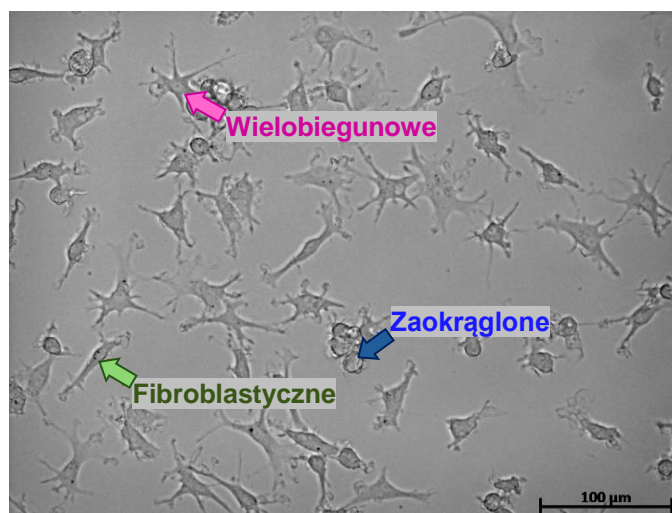


**Ryc. 7. Schemat transdyferencjacji neuronalnej z zastosowaniem metodyki 4**

\*Analiza obejmowała ocenę komórek na wskazanym etapie z zastosowaniem metody RT-qPCR i barwienia IF;

### 3.3. Obserwacja morfologii komórek

Morfologia komórek była obserwowana każdego dnia prowadzenia hodowli z zastosowaniem mikroskopu świetlnego Zeiss Axio ObserverZ1. Zdjęcia wykonano z użyciem kamery AxioCam ICC1 Zeiss i oprogramowania AxioVision. Podobnie jak w pracy Bellon i wsp. [26], komórki ze względu na swoją morfologię podzielono na następujące typy: fibroblastyczne – wydłużone i dwubiegunowe, zaokrąglone – nieposiadające żadnych wypustek, wielobiegunowe – posiadające liczne wypustki oraz nieokreślone, których nie można zaliczyć do poprzednich grup (Ryc. 8). Odsetek typów komórek został ustalony poprzez zliczenie komórek z wykonanych zdjęć (n=3), określenie średniej i wyznaczenie udziału procentowego w całej populacji.



Ryc. 8. Typy komórek określone na podstawie morfologii

### 3.4. Izolacja RNA

W celu przeprowadzenia izolacji RNA z monocytów, SH-SY5Y i komórek uzyskanych w wyniku procesu transróżnicowania, konieczne było ich odklejenie od dna naczynia hodowlanego poprzez inkubację z Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, nr kat.: T3924). Komórki przepłukano dwukrotnie PBS. Następnie zalano je 50 μL roztworu lizującego, składającego się z buforu SingleShot Cell Lysis Buffer, roztworu proteinazy K oraz roztworu DNazy (odczynniki wchodziły w skład zestawu BioRad, nr kat.: 1725095) i inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej. Następnie przeniesiono supernatant do nowej probówki, którą umieszczono w bloku grzewczym w temperaturze 37°C przez 5 min, po czym przeniesiono do 75°C również na 5 min. Tak przygotowany lizat przechowywano w -80°C.

### 3.5. RT-qPCR

Odwrotną transkrypcję (RT – ang. *reverse transcription*) wyizolowanego RNA wykonano z zastosowaniem zestawu smART First Strand cDNA Synthesis kit (EurX, nr kat.: E0804). 10  $\mu$ L RNA umieszczono w nowym falkonie, do którego dodano: 1  $\mu$ L hexamer primer, 1  $\mu$ L dNTP Mix oraz 0,5  $\mu$ L wody. Następnie mieszaninę uzupełniono kolejno: 4  $\mu$ L cDNA Buffer, 2  $\mu$ L DTT, 0,5  $\mu$ L RNase inhibitor i 1  $\mu$ L smART. Próbkę inkubowano w bloku termicznym w temperaturze 25°C przez 10 min, 50°C przez 50 min i 85°C przez 5 min. Uzyskane cDNA przechowywano w -20°C.

Ilościową łańcuchową reakcją polimerazy (qPCR – ang. *quantitative polymerase chain reaction*) przeprowadzono stosując LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, nr kat.: 04707516001) i startery dla następujących genów badanych: MAP2, TUBB3, ASCL1, CD14 (startery firmy BioRad, nr kat.: 10025636) oraz genu referencyjnego PARP1 (sekwencja startera lewego: GAAGCTGGAGGAGTGACAGG, sekwencja startera prawego: GCTGCAAAGTCACCCAGAG, Genomed). Stosowano 1  $\mu$ L cDNA i 0,5  $\mu$ L startera w reakcji o objętości 10  $\mu$ L. Reakcje przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Analiza została przeprowadzona z zastosowaniem systemu LightCycler 480 II firmy Roche. Wartości Ct (numer cyklu, w którym fluorescencja badanej próbki osiąga poziom linii progowej, ang. *cycle threshold*) zostały wyznaczone zarówno dla genów badanych, jak i genu referencyjnego z automatycznie określoną linią progową i linią bazową. W celu określenia poziomu relatywnej ekspresji genów komórek transróżnicowanych i SH-SY5Y względem monocytów stosowano metodę obliczeń  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### 3.6. Barwienie immunofluorescencyjne

Komórki utrwalono 2% zbuforowanym formaldehydem poprzez 15 minutową inkubację. Następnie komórki zostały obmyte buforem płuczącym (woda destylowana wzbogacona 1% PBS) i poddane permeabilizacji aby zwiększyć przepuszczalność błony komórkowej, za pomocą 5 minowej inkubacji z Triton X-100 (LifeTechnologies, nr kat.: HFH10). Kolejnym etapem było blokowanie, mające na celu ograniczenie powstania nieswoistych wiązań antygen-przeciwciało, za pośrednictwem inkubacji komórek z roztworem albuminy surowicy bydlęcej (BSA - ang. *bovine serum albumin*) przez 1h. Tak przygotowany materiał wyznaczono przeciwciałami I-rzędowymi (Tab. 5) poprzez całonocną inkubację w 4°C. Następnego dnia komórki zostały trzykrotnie obmyte buforem płuczającym i inkubowane z przeciwciałami II-rzędowymi przez 1 h w

temperaturze pokojowej. Niezwiązane przeciwciała zostały usunięte przez obmycie komórek buforem płuczącym. Jądra komórkowe zostały wybarwione za pomocą DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol). Obserwację wybarwionych komórek przeprowadzono z zastosowaniem mikroskopu fluorescencyjnego Olympus BX41TF. Zdjęcia zostały wykonane na powiększeniu x20 za pomocą kamery F-View II, adapterów U-CMAD3, U-TV1X-2 firmy Olympus i programu CellF.

**Tab. 5. Przeciwciała stosowane w barwieniu immunofluorescencyjnym**

Przeciwciało	Stężenie	Producent
Anty – MAP2 rabbit	1:50	Invitrogen, nr kat.: PA5-17646
Anty – TUJ1 mouse	1:200	Invitrogen, nr kat.: MA1-118
Anty – ASCL1 rabbit	1:250	Invitrogen, nr kat.: PA5-77868
Anty – SYP rabbit	1:50	Invitrogen, nr kat.: MA5-14532
Anty – CD14 rabbit	1:100	Invitrogen, nr kat.: MA5-32248
Anty – rabbit AlexaFluor 488	10 µg/mL	Invitrogen, nr kat.: A11008
Anty – rabbit TRITC	10 µg/mL	Invitrogen, nr kat.: A16101
Anty – mouse FITC	10 µg/mL	Invitrogen, nr kat.: F2761
Anty – mouse AlexaFluor 594	10 µg/mL	Invitrogen, nr kat.: A11005

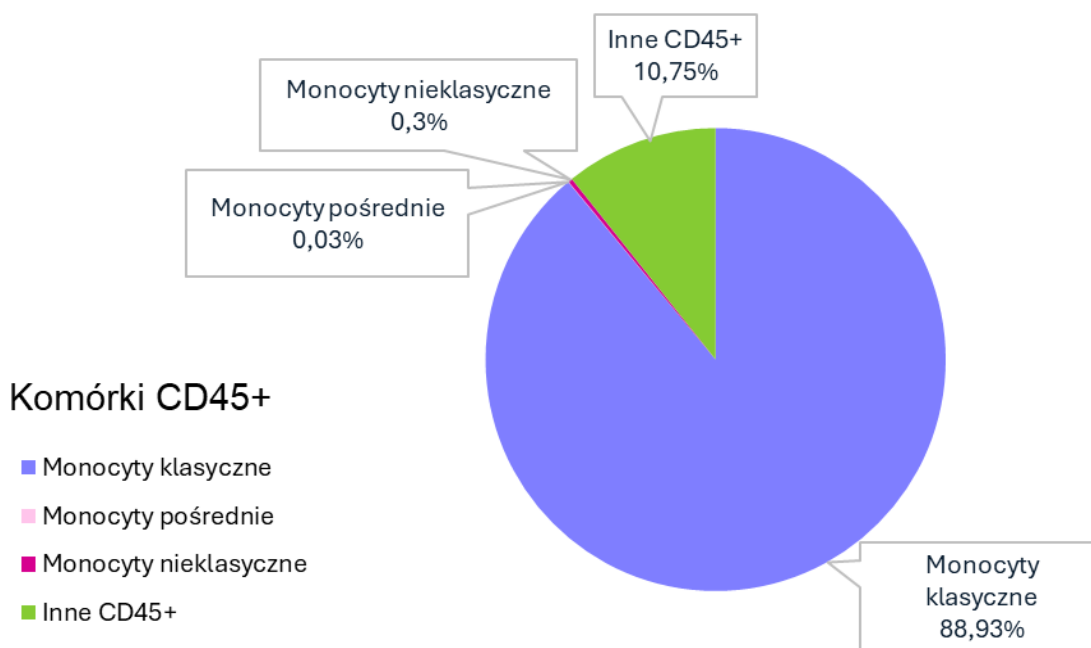
### 3.7. Analiza statystyczna

Uzyskane dane z reakcji qPCR poddano analizie statystycznej z zastosowaniem środowiska R. W pierwszej kolejności ustalono normalność rozkładu danych za pomocą testu Shapiro – Wilka. Następnie w zależności od uzyskanego wyniku testu porównano między sobą poziom relatywnej ekspresji genów komórek pozyskiwanych w wyniku przeprowadzenia transdiferencjacji metodą 1 – metodą 4 stosując test T Studenta, dla danych o normalnym rozkładzie i test U Manna – Whitneya – Wilcoxona dla danych o nienormalnym rozkładzie. Wartość *p-value*, która umożliwiła stwierdzenie wystąpienia różnic pomiędzy badanymi grupami danych wynosiła minimalnie  $p\text{-value} \leq 0,05$ . W celu zaprezentowania danych wykonano wykresy słupkowe i mapy cieplne za pomocą programu GraphPad Prism 10.

## 4. Wyniki

### 4.1. Czystość wyizolowanej populacji monocytów

Ilość wyizolowanych monocytów różniła się w poszczególnych próbach i mieściła się w przedziale 505 000 komórek – 1 845 000 komórek (Tab. S1). Populacja komórek CD45+ stanowiła średnio 5,77% ( $\pm 1,25$ ) wyizolowanych komórek i składała się w 89,25% ( $\pm 1,07$ ) z monocytów oraz w 10,75 % ( $\pm 1,07$ ) innych komórek CD45+ (Ryc. 9). Monocyty zostały rozdzielone na subpopulacje monocytów klasycznych CD14++ CD16-, monocytów pośrednich CD14++ CD16+ i monocytów nieklasycznych CD14+ CD16 ++. Komórki CD14++ CD16- stanowiły największy odsetek monocytów - średnio 99,63 % ( $\pm 0,06$ ). Najmniejszy odsetek populacji monocytów stanowiły komórki CD14++ CD16+ - średnio 0,03 % ( $\pm 0,01$ ). Monocyty nieklasyczne stanowiły średnio 0,3 % ( $\pm 0,06$ ) populacji komórek CD45+.



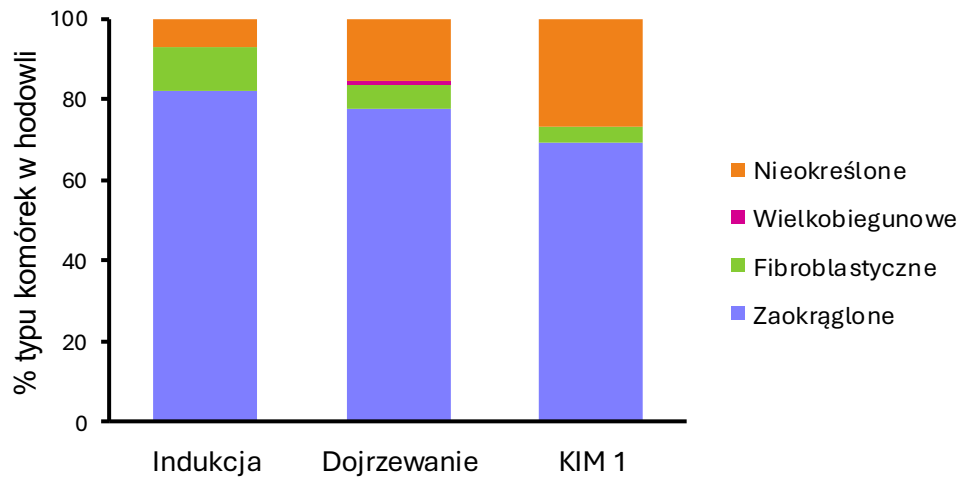
**Ryc. 9. Populacja komórek CD45+**

### 4.2. Transdyferencjacja monocytów z zastosowaniem metodyki 1

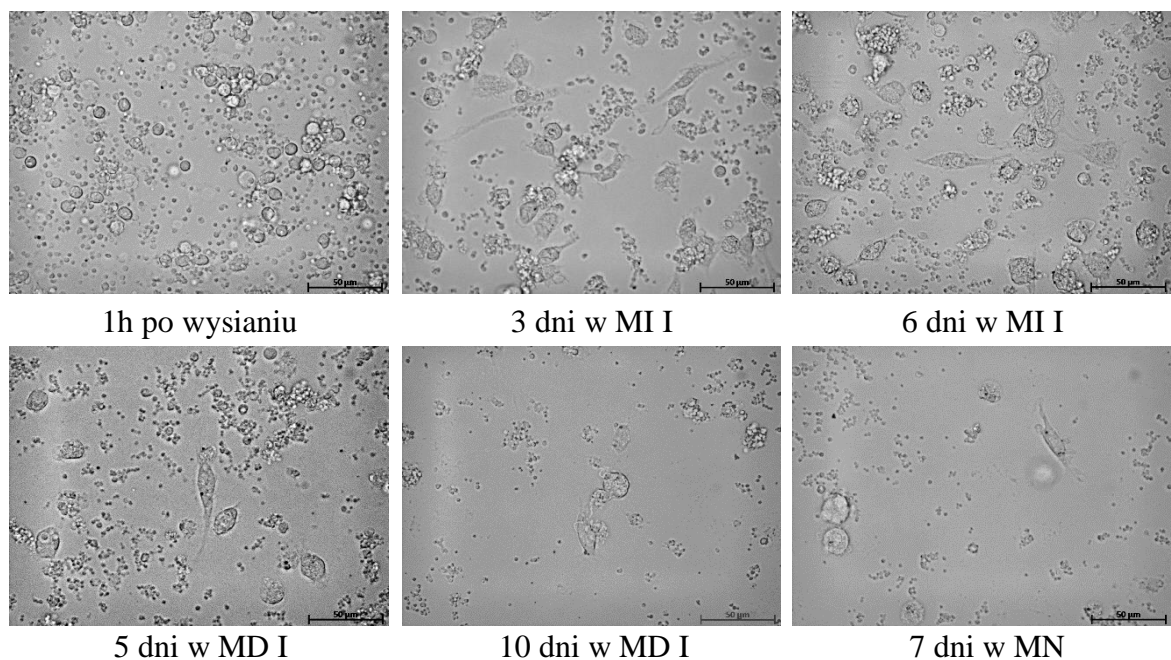
#### 4.2.1. Zmiany morfologiczne indukowanych komórek

Pierwsze zmiany morfologiczne monocytów spostrzeżono po 3 dniach inkubacji w medium indukującym I. Zaobserwowano wystąpienie pojedynczych komórek dwubiegunowych, o wydłużonym kształcie (fibroblastyczne) oraz komórek niezidentyfikowanych (Ryc. 10 i Ryc. 11). Wraz z wydłużeniem czasu inkubacji w MI I

liczba komórek fibroblastycznych ulegała nieznacznemu zwiększeniu. Po wymianie medium na medium dojrzewające I, część komórek obumarła, liczba komórek fibroblastycznych uległa redukcji. Wydłużenie czasu inkubacji w MD I skutkowało obumarciem znacznej części komórek oraz zmniejszeniem liczby komórek fibroblastycznych. Wymiana medium na MN nie spowodowała znacznych różnic w morfologii obserwowanych komórek.



**Ryc. 10. Odsetek typów komórek występujących w hodowli – metodyka 1**

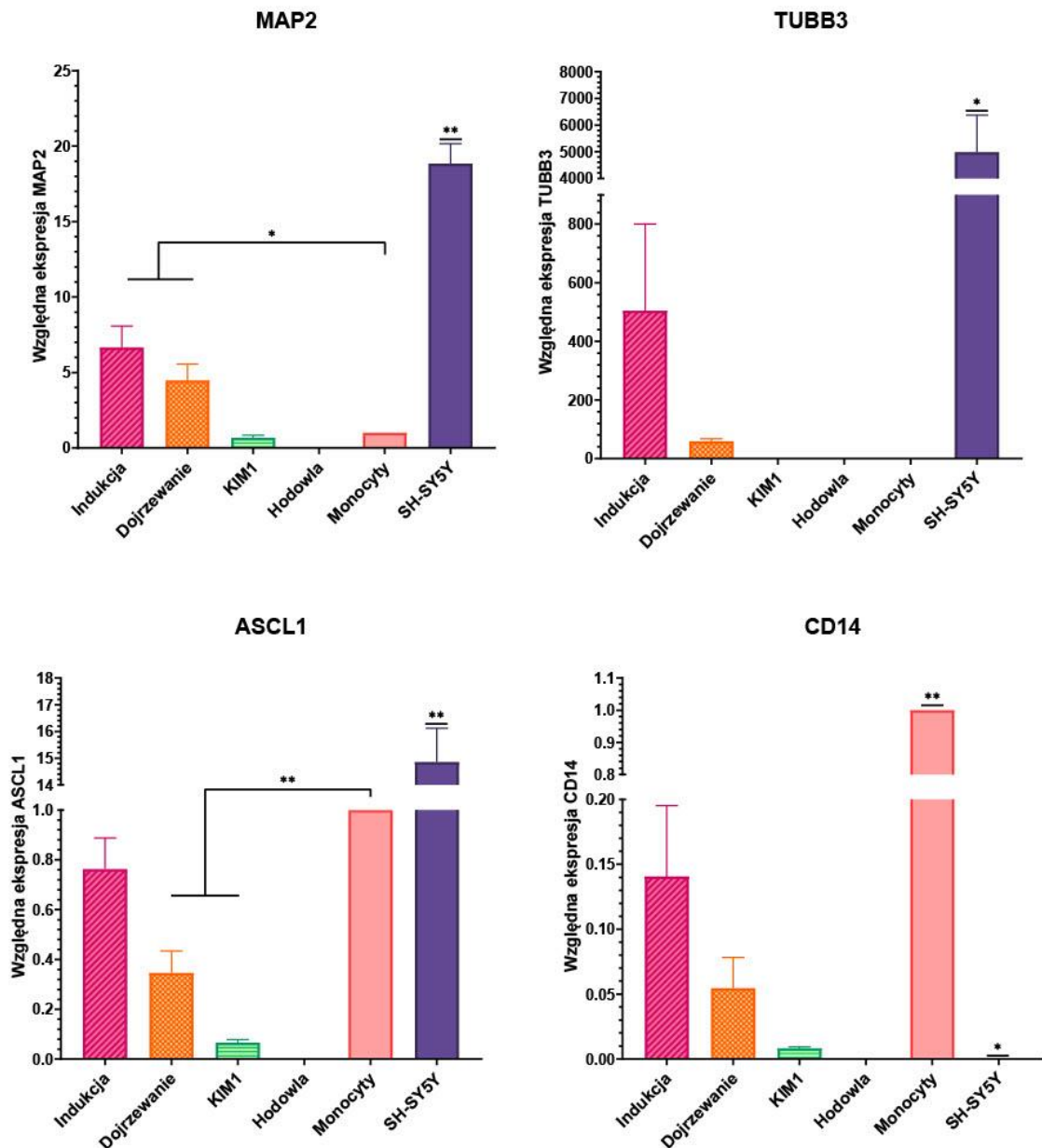


**Ryc. 11. Zmiany morfologiczne monocytów transróżnicowanych z zastosowaniem metodyki 1**



#### **4.2.2. Zmiany indukowanych komórek na poziomie genetycznym**

Obserwowane zmiany morfologiczne zostały stwierdzone również na poziomie genetycznym (Ryc. 12). Po etapie indukcji komórki wykazały wzrost ekspresji genu TUBB3, istotny wzrost ekspresji genu MAP2 ( $p < 0,05$ ) oraz istotne zmniejszenie poziomu ekspresji genu CD14 ( $p < 0,005$ ). Pięciodniowa inkubacja komórek w MD I spowodowała obniżenie poziomu ekspresji genów neuronalnych MAP2, TUBB3 i ASCL1. Zaobserwowano również zmniejszenie ekspresji genu CD14. Wraz z wydłużeniem czasu inkubacji komórek w MD I ekspresja genów neuronalnych i CD14 uległa zmniejszeniu. Poziomy ekspresji genów neuronalnych na żadnym etapie hodowli nie były porównywalne do poziomów ekspresji wykrywanych dla komórek SH-SY5Y ( $p < 0,05$  i  $p < 0,005$ ). Hodowla komórek indukowanych metodyką 1 w medium niewzbogaconym SM skutkowałą brakiem wykrywalności ekspresji badanych genów.



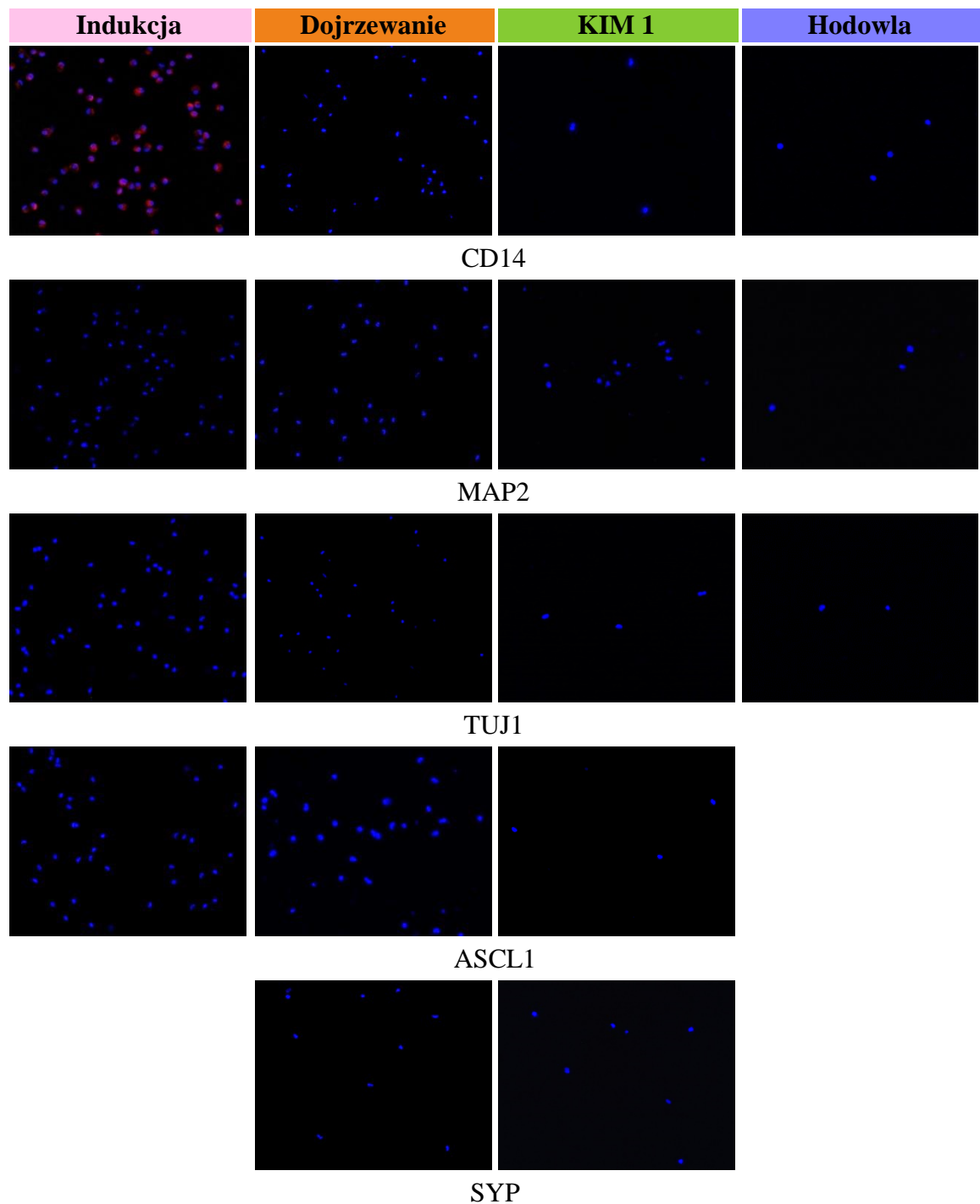
**Ryc. 12. Poziom ekspresji genów neuronalnych i CD14 na poszczególnych etapach transdyferencjacji monocytów metodyką 1**

Poziom ekspresji ustalony względem monocytów; \* $p$ -value < 0,05; \*\* $p$ -value < 0,005;

#### 4.2.3. Zmiany indukowanych komórek na poziomie białkowym

W celu określenia zachodzenia translacji badanych genów na poziom białkowy przeprowadzono barwienia immunofluorescencyjne (Ryc. 13). Po hodowli w MI I zaobserwowano sygnał fluorescencyjny dla przeciwciała any-CD14 i nie wykryto sygnałów dla przeciwciał neuronalnych. Wraz z postępowaniem przeprowadzania transdyferencjacji monocytów za pomocą metodyki 1, nie zaobserwowano zmian w sygnałach fluorescencyjnych dla przeciwciał neuronalnych - obserwowane komórki były ujemne dla przeciwciał anty-MAP2, anty-TUJ1, anty-ASCL1 i anty-SYP.

Dodatkowo po hodowli komórek w MD I sygnał fluorescencyjny dla przeciwciała anti-CD14 również zanikł.

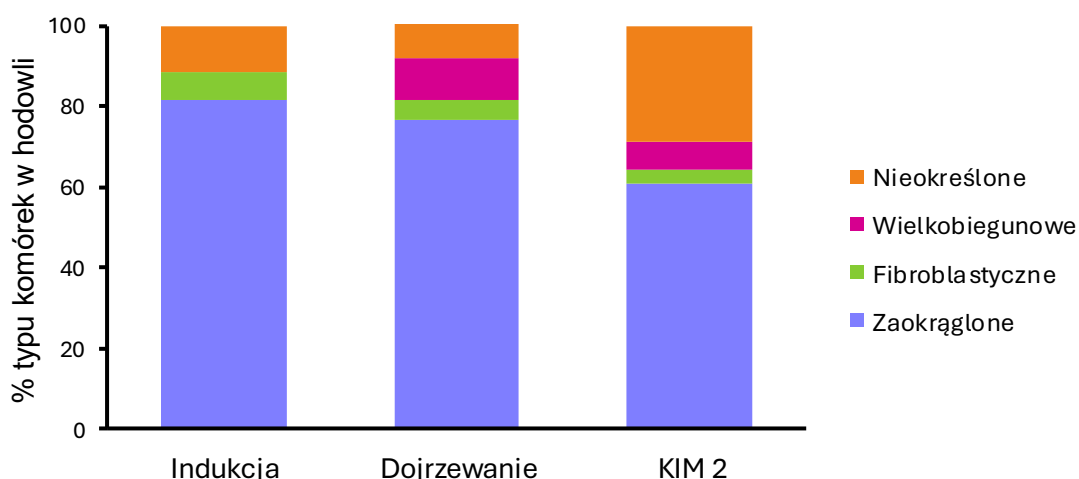


**Ryc. 13. Wyznaczenie przeciwciał neuronalnych i CD14 na poszczególnych etapach transdiferencjacji monocytów z zastosowaniem metodyki 1**

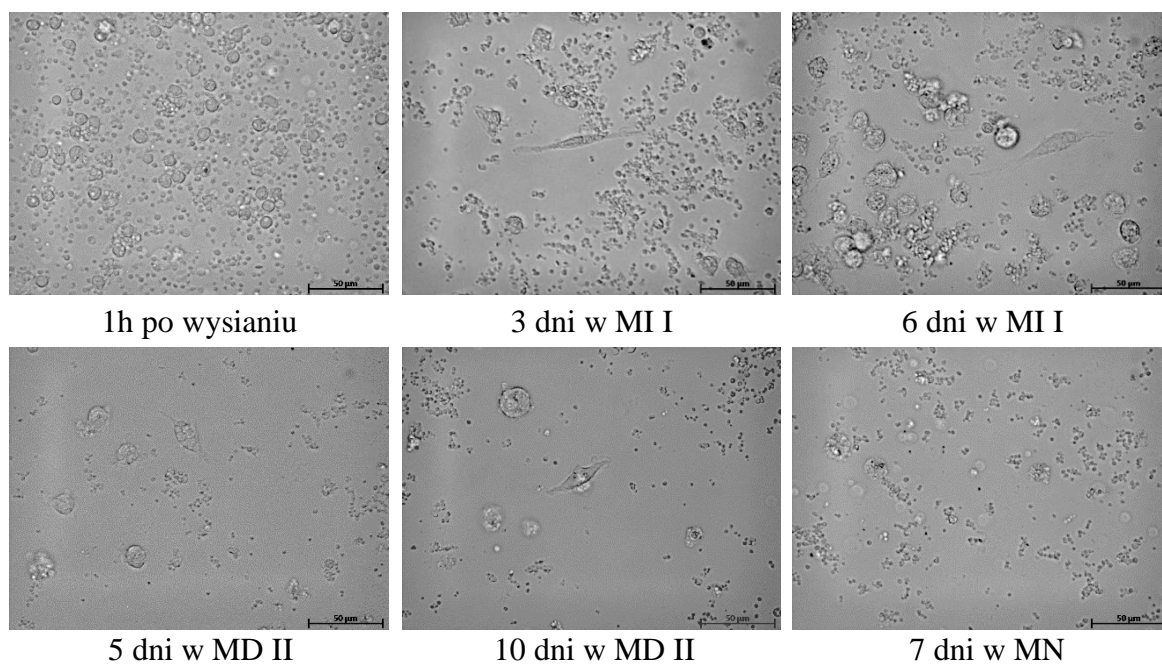
### 4.3. Transdyferencjacja monocytów z zastosowaniem metodyki 2

#### 4.3.1. Zmiany morfologiczne indukowanych komórek

Morfologia komórek uległa zmianie już trzeciego dnia inkubacji w medium indukującym I. W hodowli zaobserwowano pojedyncze komórki fibroblastyczne oraz komórki niezidentyfikowane (Ryc. 14 i Ryc. 15). Wraz z wydłużeniem czasu indukcji, liczba komórek fibroblastycznych wzrosła. Po wymianie MI I na medium dojrzewające II w hodowli można było zaobserwować komórki wielobiegunowe. Liczba komórek fibroblastycznych została zredukowana i wraz z wydłużeniem czasu inkubacji nie uległa znacznej zmianie. Dodatkowo zaobserwowano wzrost ilości komórek obumierających i większą obecność komórek niezidentyfikowanych. Po tygodniowej hodowli KIM 2 w medium bez dodatku SM obserwowane były w większości komórki zaokrąglone i niezidentyfikowane.



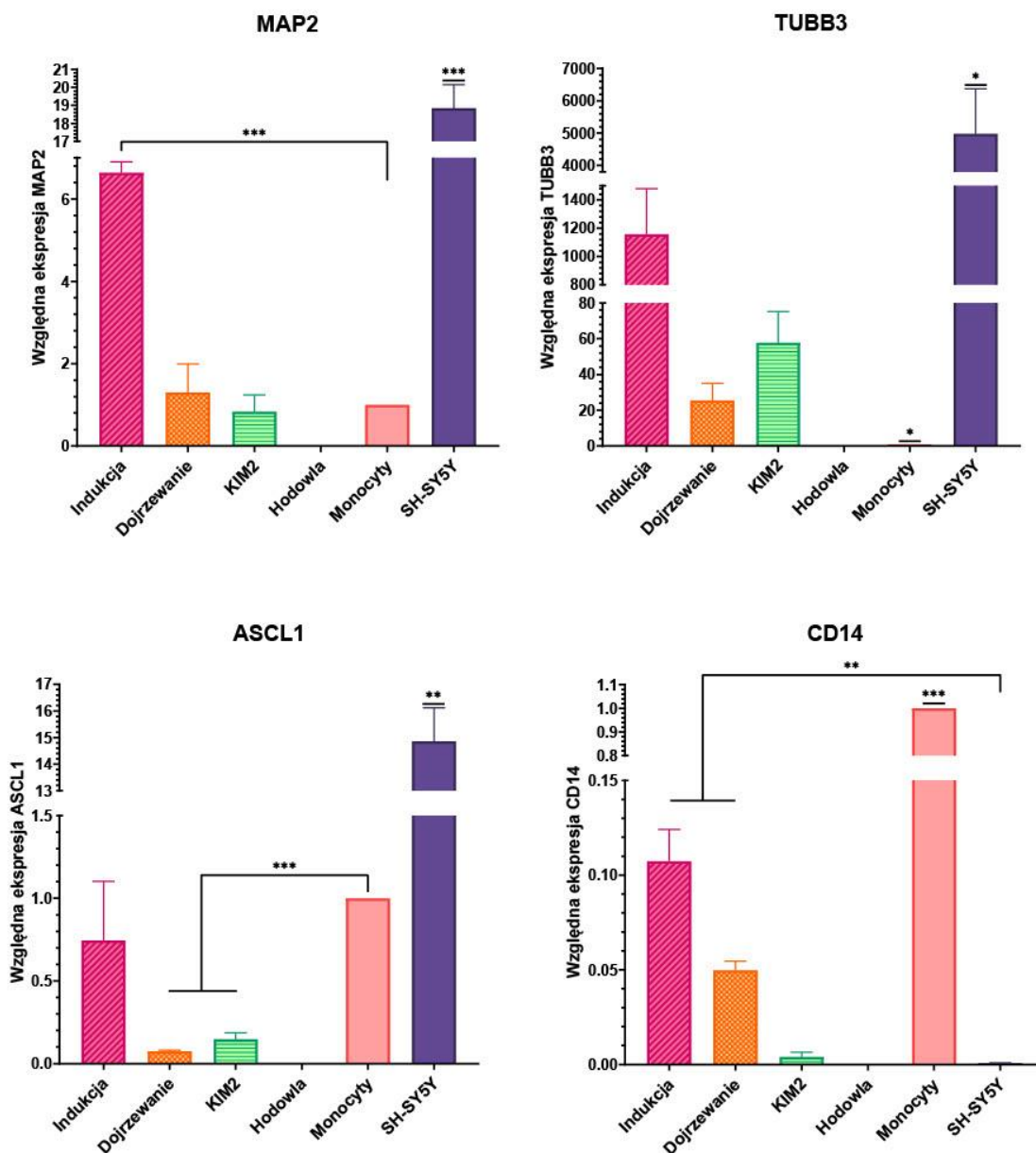
Ryc. 14. Odsetek typów komórek występujących w hodowli – metodyka 2



**Ryc. 15. Zmiany morfologiczne monocytów transróżnicowanych z zastosowaniem metodyki 2**

#### 4.3.2. Zmiany indukowanych komórek na poziomie genetycznym

Zachodzące zmiany morfologiczne znalazły odzwierciedlenie na poziomie genetycznym (Ryc. 16). Komórki indukowane w MI I wykazywały istotnie wyższy poziom ekspresji genu MAP2 ( $p < 0,0005$ ), TUBB3 ( $p < 0,05$ ) i niższą ekspresję genu CD14 ( $p < 0,0005$ ), w porównaniu do monocytów. Po przejściu do etapu dojrzewania ekspresja genu MAP2 ulegała zmniejszeniu wraz z wydłużeniem czasu inkubacji w MD II. Poziom ekspresji genu TUBB3 oraz ASCL1 dla komórek hodowanych w MD II początkowo uległ zmniejszeniu, jednak wzrósł wraz z wydłużeniem czasu inkubacji, nie przekraczając poziomu ekspresji wykrywanego dla komórek po etapie indukcji. Ekspresja genu CD14 ulegała stopniowemu zmniejszeniu w trakcie inkubacji komórek w MD II. Po tygodniowej inkubacji komórek MN nie wykryto ekspresji genów neuronalnych i CD14. Komórki transróżnicowane na żadnym etapie nie osiągnęły poziomu ekspresji genów neuronalnych porównywalnego do kontroli pozytywnej – SH-SY5Y.



**Ryc. 16. Poziom ekspresji genów neuronalnych i CD14 na poszczególnych etapach transdyferencjacji monocytych metodą 2**

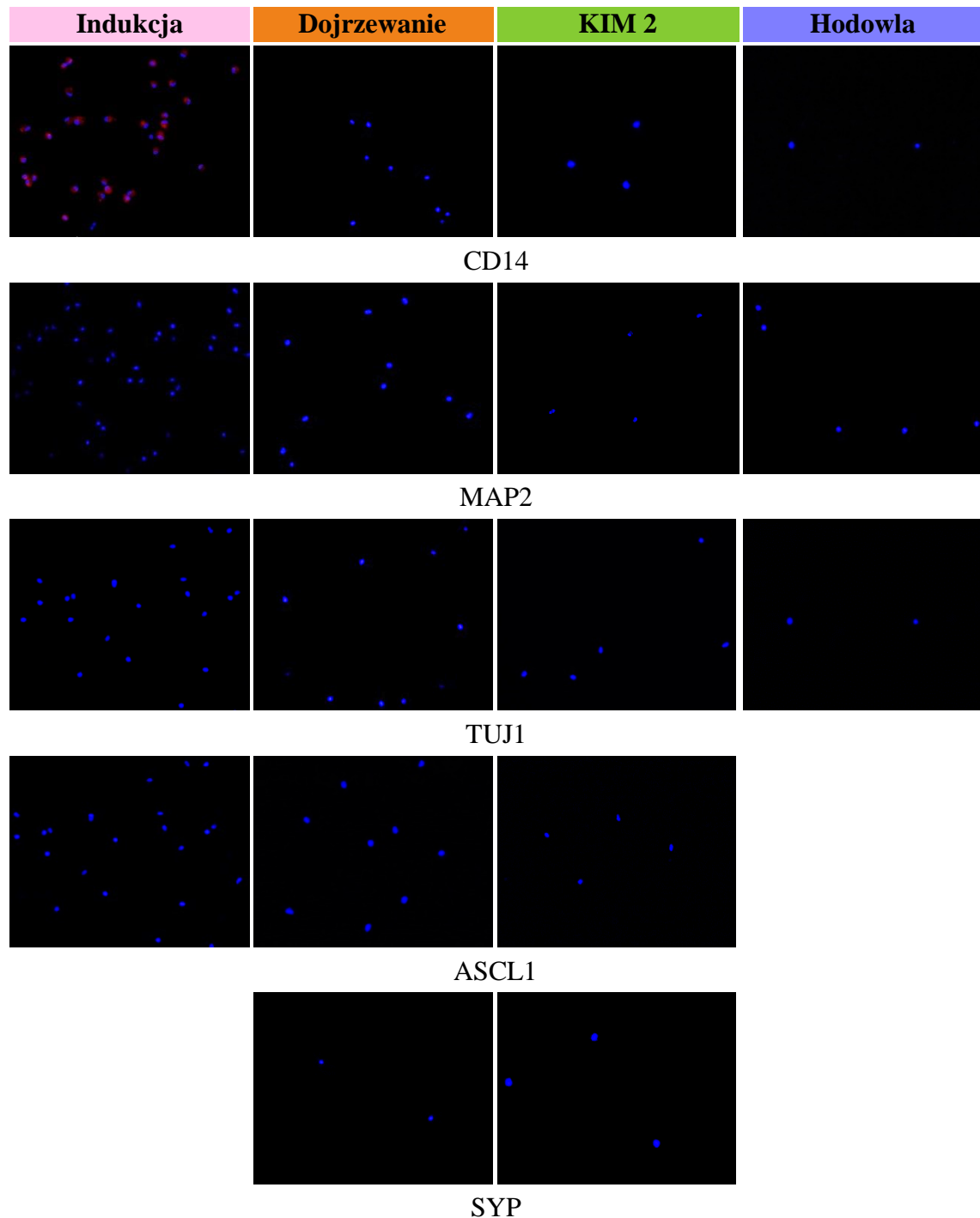
Poziom ekspresji ustalony względem monocytów; \* $p$ -value < 0,05; \*\* $p$ -value < 0,005;

\*\*\* $p$ -value < 0,0005;

#### 4.3.3. Zmiany indukowanych komórek na poziomie białkowym

Zachodzące zmiany w wyniku procesu transróżnicowania obserwowano również na poziomie białkowym poprzez zastosowanie barwienia immunofluorescencyjnego (Ryc. 17). Po hodowli komórek w MI I nie zaobserwowano sygnału fluorescencyjnego dla badanych przeciwciał neuronalnych. Kolejno przeprowadzony etap dojrzewania również nie skutkowało powstaniem komórek MAP2-, TUBB3-, ASCL1-, SYP-pozytywnych. Sygnał fluorescencyjny dla przeciwciała anti-CD14 wykrywalny był dla

komórek bezpośrednio po etapie indukcji, jednak zanikł po inkubacji w MD II. Hodowla komórek w medium pozbawionym dodatku SM nie wpłynęła na wykrywalność przeciwciał neuronalnych i CD14.

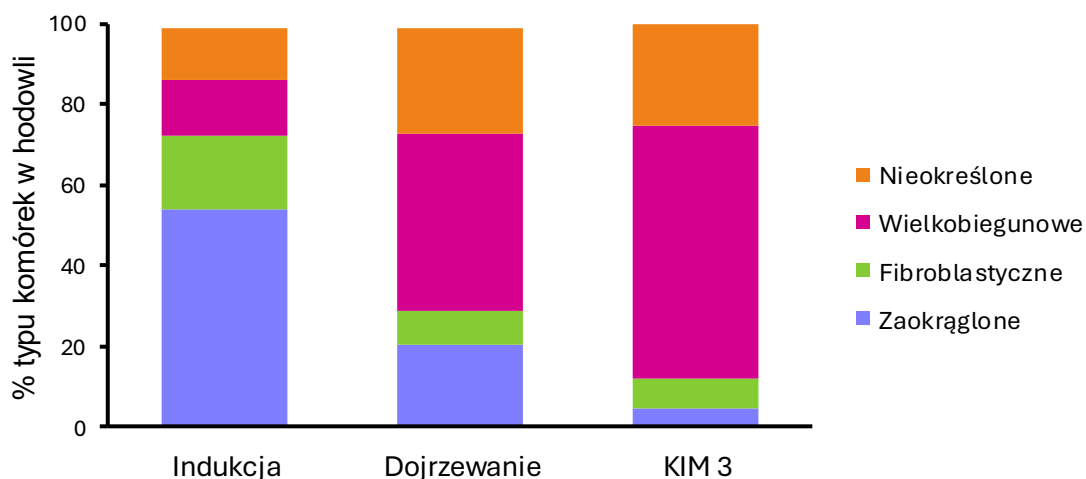


**Ryc. 17. Wyznaczenie przeciwciał neuronalnych i CD14 na poszczególnych etapach transdiferencjacji monocytów z zastosowaniem metodyki 2**

#### 4.4. Transdyferencjacja monocytów z zastosowaniem metodyki 3

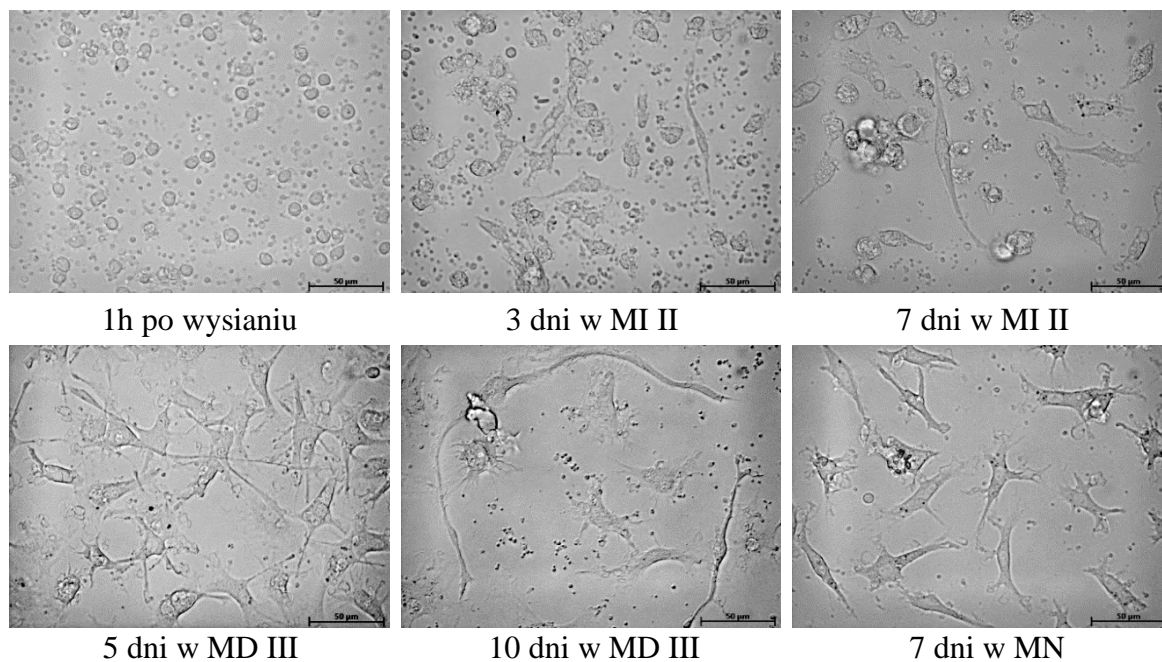
##### 4.4.1. Zmiany morfologiczne indukowanych komórek

Zmiany morfologiczne komórek zostały zaobserwowane już po 3 dniach inkubacji w medium indukującym II. Część komórek zmieniła kształt z zaokrąglonego na fibroblastyczny (Ryc. 18 i Ryc. 19). Wraz z wydłużeniem inkubacji w MI II liczba komórek fibroblastycznych wzrastała, dodatkowo zaobserwowano wystąpienie komórek wielobiegunowych i nieokreślonych. Wymiana MI II na MD III skutkowała znacznym zwiększeniem ilości komórek wielobiegunowych, które stanowiły większość obserwowanych w hodowli komórek. Ponadto, analizowane komórki nawiązywały kontakt pomiędzy sobą licznymi wypustkami. Tygodniowa inkubacja komórek w MN nie spowodowała znacznych zmian w morfologii badanych komórek.



Ryc. 18. Odsetek typów komórek występujących w hodowli – metodyka 3

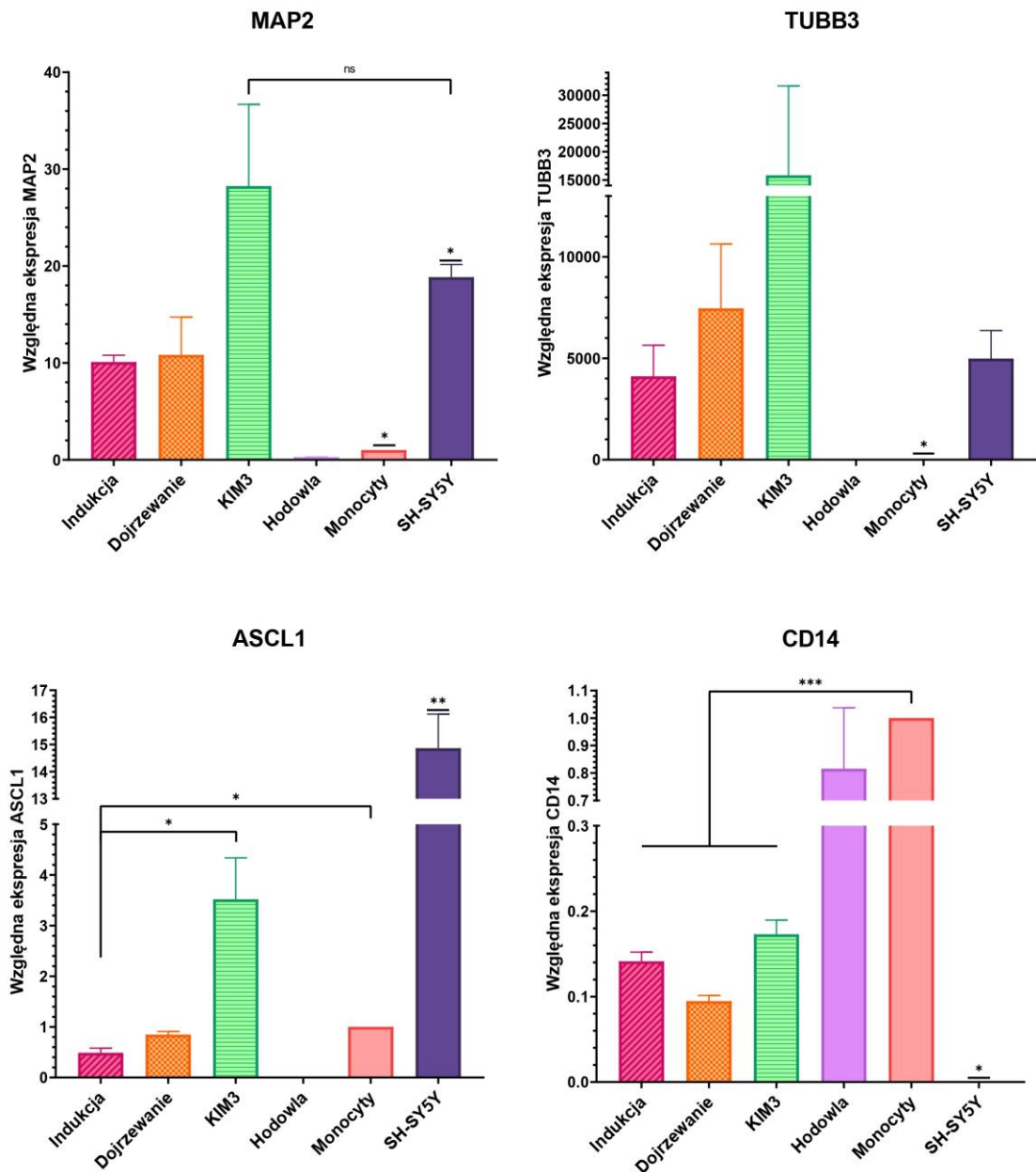




**Ryc. 19. Zmiany morfologiczne monocytów transróżnicowanych z zastosowaniem metodyki 3**

#### 4.4.2. Zmiany indukowanych komórek na poziomie genetycznym

Powstające w wyniku procesu transdiferencjacji różnice zostały również zaobserwowane na poziomie genetycznym (Ryc. 20). Stwierdzono wzrost poziomu ekspresji MAP2 i TUBB3 po etapie indukcji. Poziom genu MAP2 był istotnie wyższy w porównaniu do monocytów ( $p < 0,05$ ), a poziom ekspresji genu TUBB3 był porównywalny do ekspresji dla komórek SH-SY5Y. Dodatkowo ekspresja genu CD14 dla komórek indukowanych była istotnie niższa w porównaniu do monocytów ( $p < 0,0005$ ). W wyniku przeprowadzenia etapu dojrzewania, ekspresja genów neuronalnych stopniowo wzrastała. Poziom ekspresji MAP2 i TUBB3 dla uzyskanych komórek był porównywalny do ekspresji wykazanej dla SH-SY5Y. Ekspresja genu CD14 po etapie dojrzewania pozostała istotnie niższa w porównaniu do poziomu wykrywanego dla monocytów. Ekspresja genu ASCL1 równie wzrastała w trakcie prowadzenia procedury transróżnicowania, ale nie osiągnęła poziomu zbliżonego do ekspresji odczytywanej dla SH-SY5Y. Hodowla komórek w medium bez dodatku SM istotnie wpłynęła na poziom ekspresji badanych genów. Po tygodniowej inkubacji nie wykryto ekspresji genów neuronalnych dla badanych komórek, a poziom ekspresji genu CD14 wzrósł do poziomu porównywalnego dla monocytów.



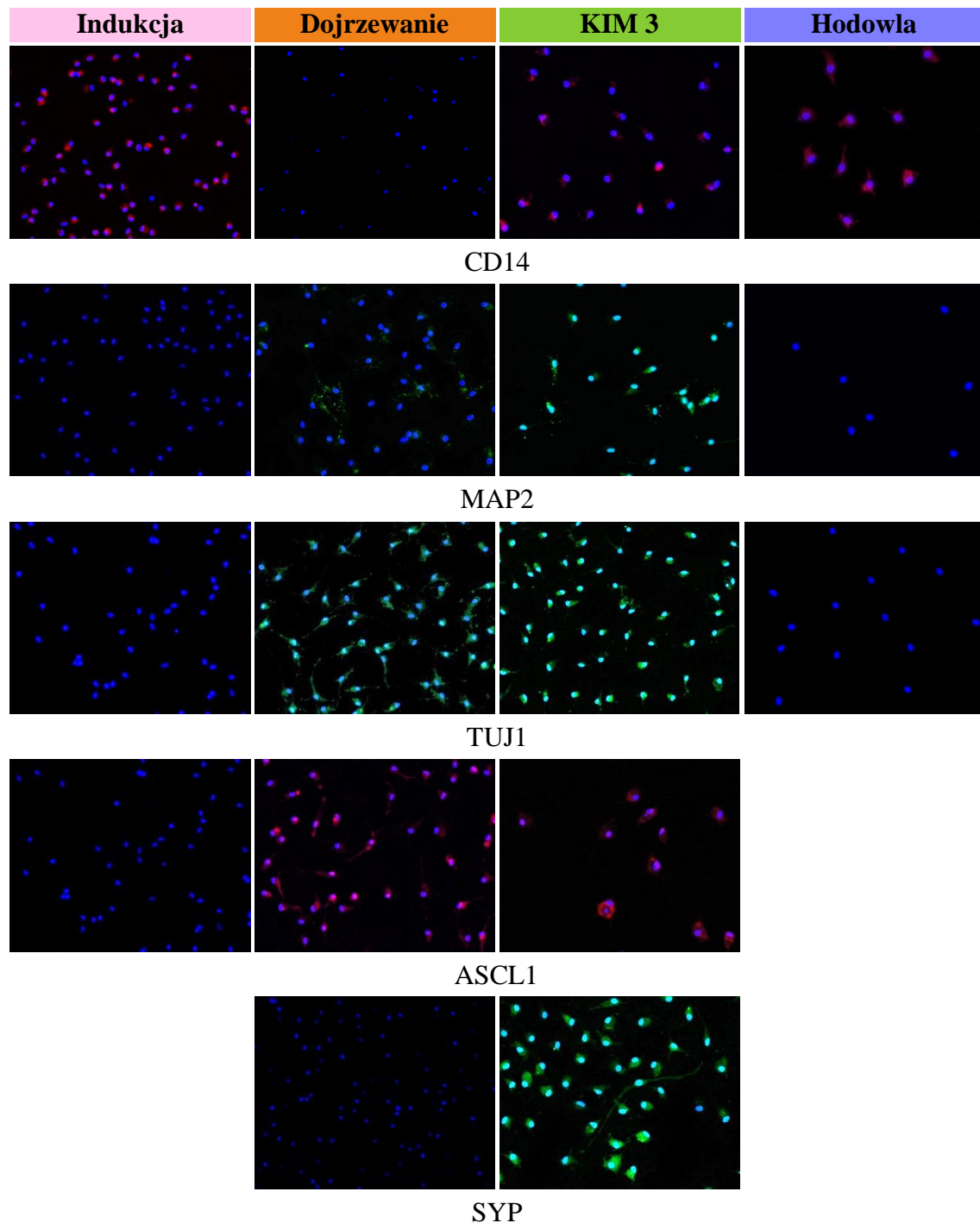
**Ryc. 20. Poziom ekspresji genów neuronalnych i CD14 na poszczególnych etapach transdyferencjacji monocytych metodą 3**

Poziom ekspresji ustalony względem monocytów; \* $p$ -value < 0,05; \*\* $p$ -value < 0,005; \*\*\* $p$ -value < 0,0005; ns – brak statystycznie istotnej różnicy;

#### 4.4.3. Zmiany indukowanych komórek na poziomie białkowym

Barwienie immunofluorescencyjne potwierdziło zachodzenie zmian na poziomie białkowym w trakcie etapu dojrzewania. Po przeprowadzeniu etapu indukcji zaobserwowano sygnał fluorescencyjny dla przeciwciała anty-CD14 i brak sygnału dla badanych przeciwciał neuronalnych (Ryc. 21). Pięciodniowa inkubacja komórek w MD III spowodowała zanik sygnału dla przeciwciała anty-CD14 i pojawienie się sygnałów

dla przeciwciał anti-MAP2, anti-TUJ1 i anti-ASCL1. Dodatkowo wydłużenie czasu inkubacji komórek w MD III skutkowało wykryciem komórek SYP-pozytywnych i ponownie CD14-pozytywnych. KIM 3 hodowane w MN przez 7 dni nie wykazały sygnału fluorescencyjnego dla przeciwciał anti-MAP2 i anti-TUJ1, jednak pozostały pozytywne dla przeciwciała CD14.

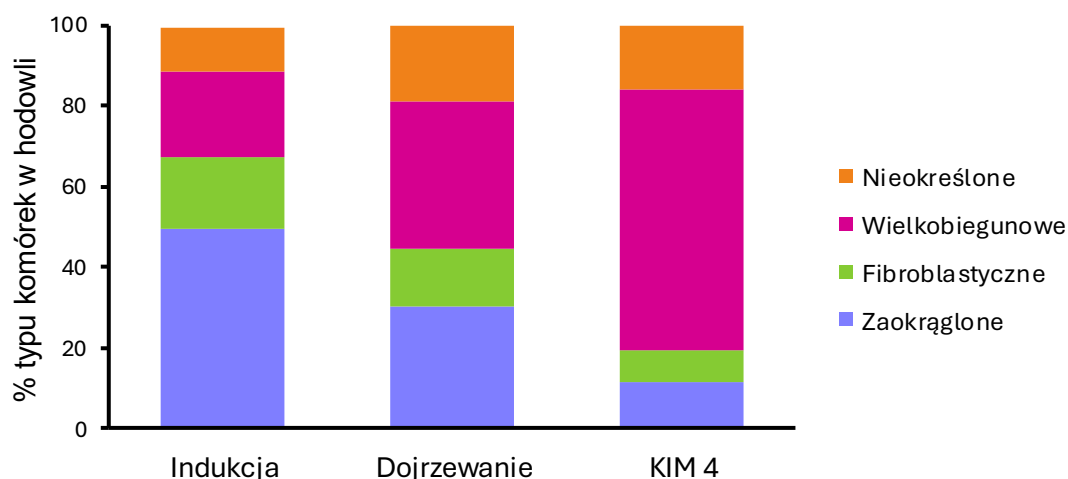


**Ryc. 21. Wyznaczenie przeciwciał neuronalnych i CD14 na poszczególnych etapach transdiferencjacji monocytów z zastosowaniem metodyki 3**

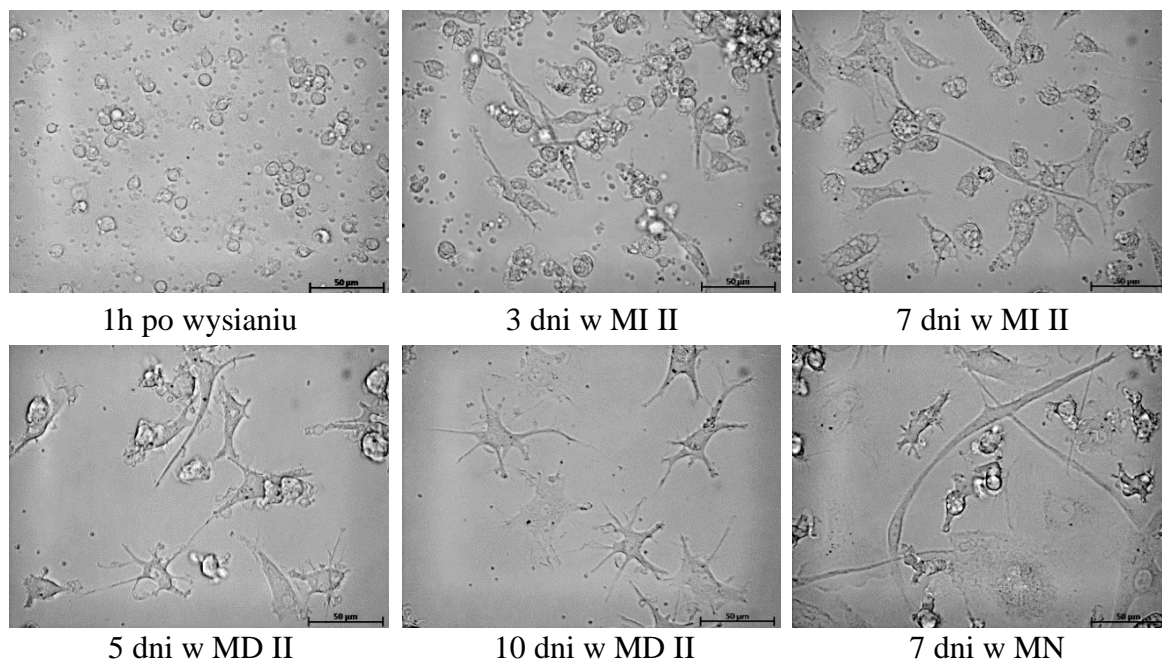
## 4.5. Transdyferencjacja monocytów z zastosowaniem metodyki 4

### 4.5.1. Zmiany morfologiczne indukowanych komórek

Pierwsze różnice w morfologii komórek zaobserwowano trzeciego dnia indukcji. Część zaokrąglonych komórek zmieniła kształt na fibroblastyczny (Ryc. 22 i Ryc. 23). W kolejnych dniach hodowli w MI II zwiększała się liczba komórek fibroblastycznych oraz pojawiły się komórki wielobiegunowe i niezidentyfikowane. Po wymianie medium na MD II zaobserwowano wzrost liczby komórek wielobiegunowych i niezidentyfikowanych. Wraz z wydłużeniem czasu inkubacji komórek w MD II ilość komórek wielobiegunowych zwiększała się i stanowiła większość komórek obecnych w hodowli. Dodatkowo komórki nawiązywały pomiędzy sobą kontakt za pomocą wypustek. Siedmiodniowa inkubacja uzyskanych komórek w MN spowodowała niewielkie zwiększenie ilości komórek fibroblastycznych.



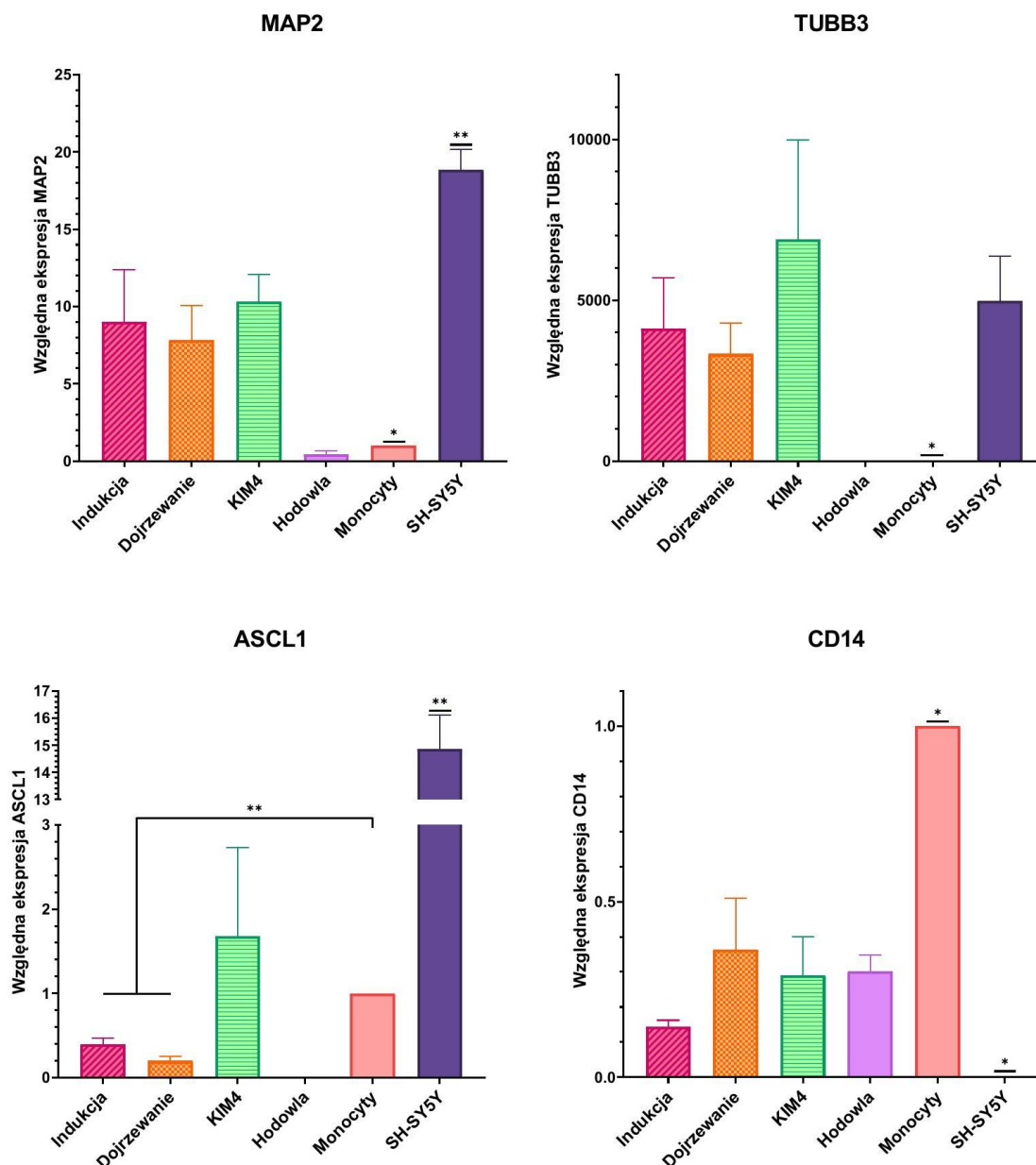
Ryc. 22. Odsetek typów komórek występujących w hodowli – metodyka 4



**Ryc. 23. Zmiany morfologiczne monocytów transróżnicowanych z zastosowaniem metodyki 4**

#### 4.5.2. Zmiany indukowanych komórek na poziomie genetycznym

Zajście procesu transdyferencjacji potwierdzono na poziomie genetycznym (Ryc. 24). Po etapie indukcji zaobserwowano wzrost ekspresji analizowanych genów neuronalnych – MAP2 i TUBB3. Stwierdzono istotnie wyższy poziom ekspresji genu MAP2 dla komórek badanych w porównaniu do monocytów ( $p < 0,05$ ) oraz porównywalny poziom ekspresji genu TUBB3 dla komórek indukowanych i SH-SY5Y. Dodatkowo poziom ekspresji genu CD14 był istotnie niższy dla badanych komórek niż dla monocytów ( $p < 0,05$ ). Ekspresja genu ASCL1 uległa zmniejszeniu po etapie indukcji. Wymiana MI II na MD II skutkowała nieznacznym zmniejszeniem ekspresji badanych genów neuronalnych, jednak ich poziom zwiększył się wraz z wydłużeniem czasu inkubacji komórek. Uzyskane komórki indukowane metodyką 4 charakteryzowały się poziomem ekspresji TUBB3 zbliżonym do SH-SY5Y, istotnie wyższą ekspresją genu MAP2 ( $p < 0,05$ ) i istotnie niższym poziomem ekspresji CD14 ( $p < 0,05$ ) w porównaniu do monocytów. Poziom ekspresji ASCL1 pozostał zbliżony do ekspresji obserwowanej dla monocytów. Hodowla uzyskanych komórek w medium bez dodatku SM spowodowała brak ekspresji genów TUBB3 i ASCL1 oraz obniżenie poziomu ekspresji genów MAP2.



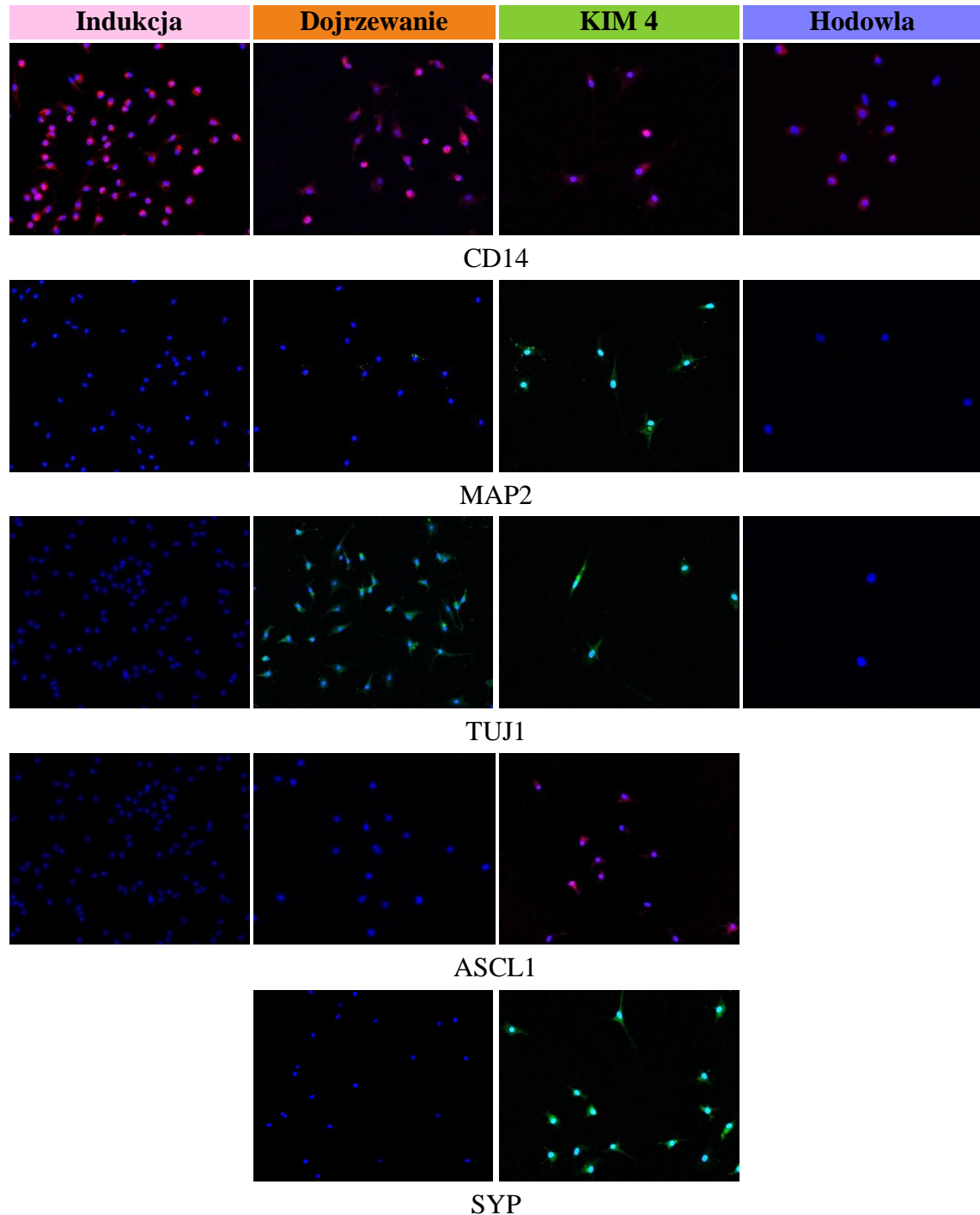
**Ryc. 24. Poziom ekspresji genów neuronalnych i CD14 na poszczególnych etapach transdiferencjacji monocytów metodyką 4**

Poziom ekspresji ustalony względem monocytów; \* $p$ -value < 0,05; \*\* $p$ -value < 0,005;

#### 4.5.3. Zmiany indukowanych komórek na poziomie białkowym

Zmiany zachodzące na poziomie białkowym określono z zastosowaniem barwienia immunofluorescencyjnego. Po hodowli komórek w MI II nie wykryto sygnału fluorescencyjnego dla analizowanych przeciwciał neuronalnych (Ryc. 25). Obserwowane komórki były CD14 - pozytywne. Inkubacja komórek w MD II skutkowałą pozyskaniem komórek MAP2- i TUJ1- pozytywnych. Wraz z wydłużeniem czasu etapu dojrzewania zaobserwowano również komórki ASCL1- i SYP- pozytywne.

Komórki inkubowane w MN utraciły sygnał fluorescencyjny dla przeciwciał anti-MAP2 i anti-TUJ1. Przeciwciało CD14 było wykrywane na każdym etapie procesu transdiferencjacji.



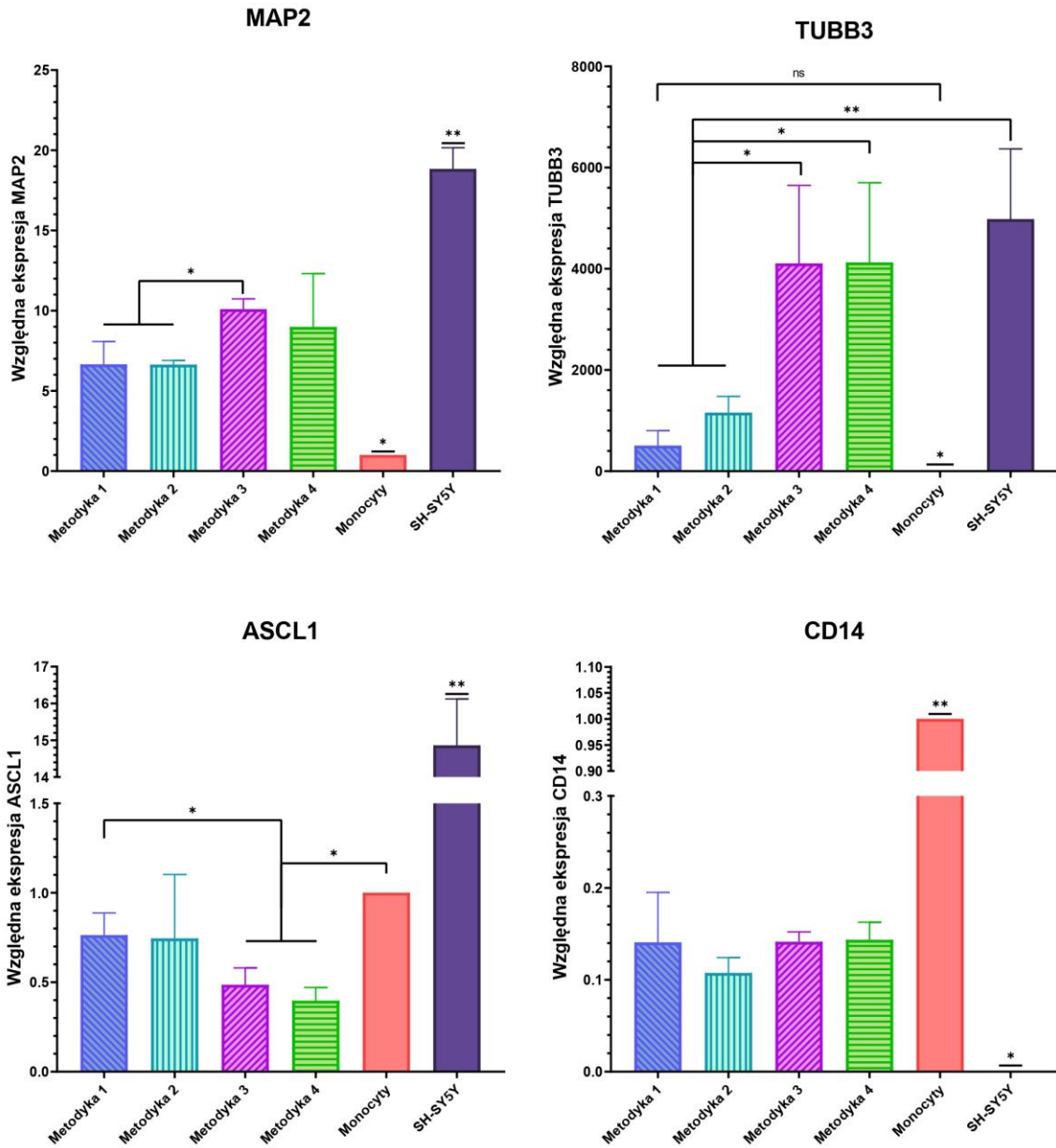
**Ryc. 25.** Wyznaczenie przeciwciał neuronalnych i CD14 na poszczególnych etapach transdiferencjacji monocytów z zastosowaniem metodyki 4

## **4.6. Porównanie badanych metodyk transdiferencjacji monocytów w komórki neuronalne na poziomie genetycznym**

### **4.6.1. Indukcja**

Komórki indukowane z zastosowaniem MI I charakteryzowały się odmiennym poziomem ekspresji genów neuronalnych od komórek indukowanych MI II (Ryc. 26). Zaobserwowano istotnie wyższy poziom ekspresji genu TUBB3 ( $p < 0,05$ ) dla komórek inkubowanych w MI II, w porównaniu do komórek indukowanych metodyką 1. Dodatkowo komórki indukowane metodyką 3 wykazały istotnie wyższą ekspresję genu MAP2 ( $p < 0,05$ ) od komórek inkubowanych w MI I. Przeciwnie, w przypadku ekspresji genu ASCL1 odnotowano istotnie wyższą ekspresję ( $p < 0,05$ ) dla komórek traktowanych MI I w porównaniu do komórek indukowanych z użyciem MI II. Ekspresja genu CD14 nie różniła się istotnie pomiędzy komórkami uzyskanymi w wyniku przeprowadzenia etapu indukcji testowanych metodyk.

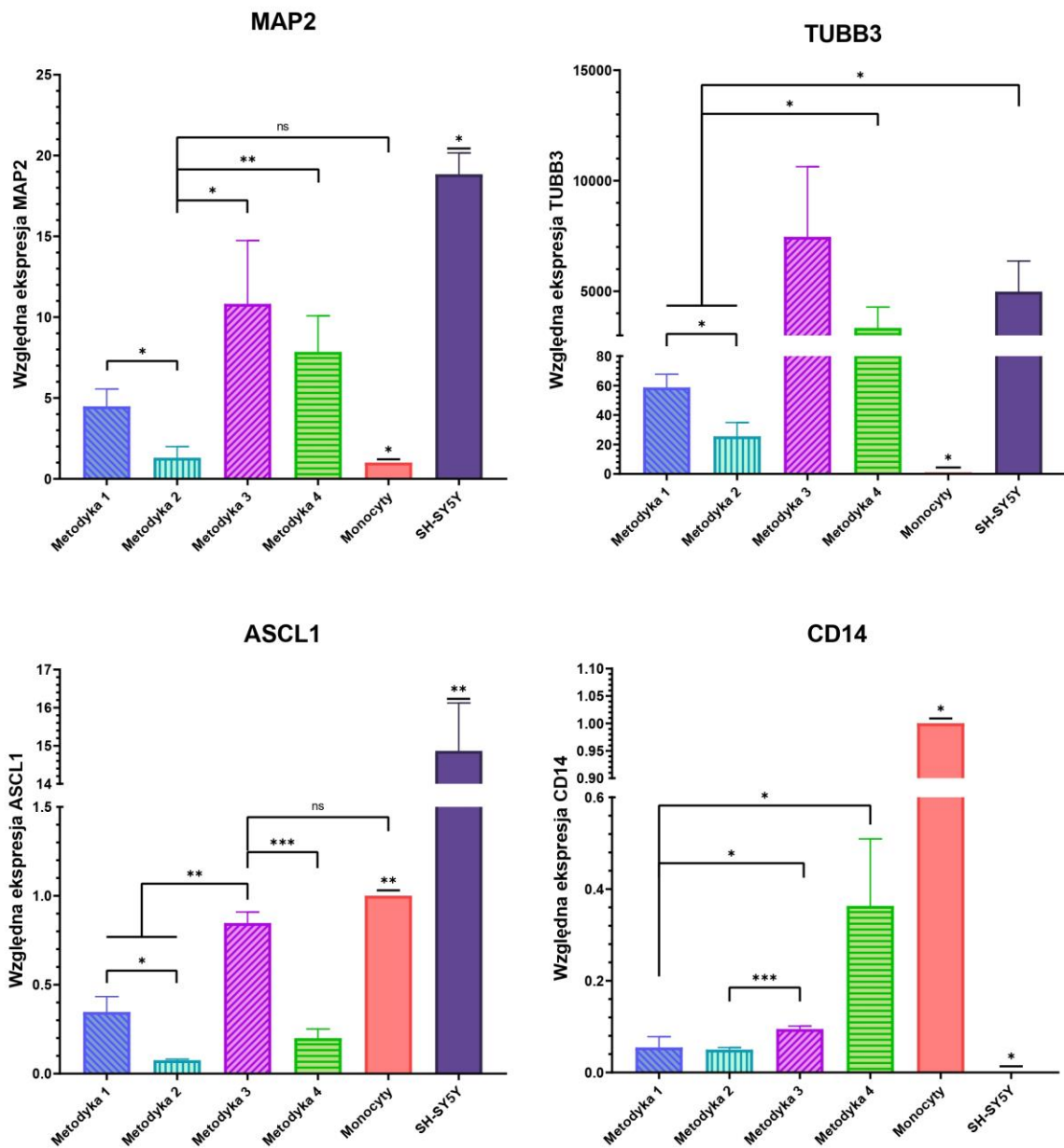




**Ryc. 26. Poziom ekspresji genów neuronalnych i CD14 dla komórek uzyskanych w wyniku przeprowadzenia etapu indukcji testowanych metodyk transdiferencjacji**  
 Poziom ekspresji ustalony względem monocytów; \**p-value* < 0,05; \*\**p-value* < 0,005;  
 ns – brak statystycznie istotnej różnicy;

#### 4.6.2. Dojrzewanie

W wyniku inkubacji komórek w mediach dojrzewających doszło do zmian w poziomach ekspresji obserwowanych genów (Ryc. 27). W przypadku genu MAP2 stwierdzono istotnie niższą ekspresję ( $p < 0,05$  i  $p < 0,005$ ) dla komórek traktowanych metodyką 2 od komórek hodowanych zgodnie z procedurami pozostałych, testowanych metodyk. Podobnie istotnie niższa ekspresja genu TUBB3 ( $p < 0,05$ ) została zaobserwowana dla komórek hodowanych zgodnie z metodyką 2, w porównaniu do komórek inkubowanych w mediach metodyki 1 i metodyki 4. Ponadto nie stwierdzono różnic w poziomie ekspresji genów MAP2 i TUBB3 pomiędzy komórkami uzyskanymi wyniku przeprowadzenia połowy etapu dojrzewania metodyką 3 i metodyką 4. Obserwując poziom ekspresji genu ASCL1, odnotowano istotnie wyższą ekspresję ( $p < 0,005$  i  $p < 0,0005$ ) dla komórek inkubowanych w MD III od komórek hodowanych w pozostałych, testowanych mediach dojrzewających. Dodatkowo stwierdzono istotnie niższą ekspresję ASCL1 ( $p < 0,05$ ) dla komórek traktowanych zgodnie z metodyką 2, porównaniu do komórek inkubowanych w MD I. W przypadku genu CD14 zaobserwowano wyższy poziom ekspresji ( $p < 0,05$ ) dla komórek hodowanych w mediach metodyki 4 i metodyki 3 od komórek traktowanych MD I. Analogicznie komórki hodowane w MD III wykazywały wyższy poziom ekspresji CD14 w porównaniu do komórek inkubowanych zgodnie z metodyką 2 ( $p < 0,0005$ ).

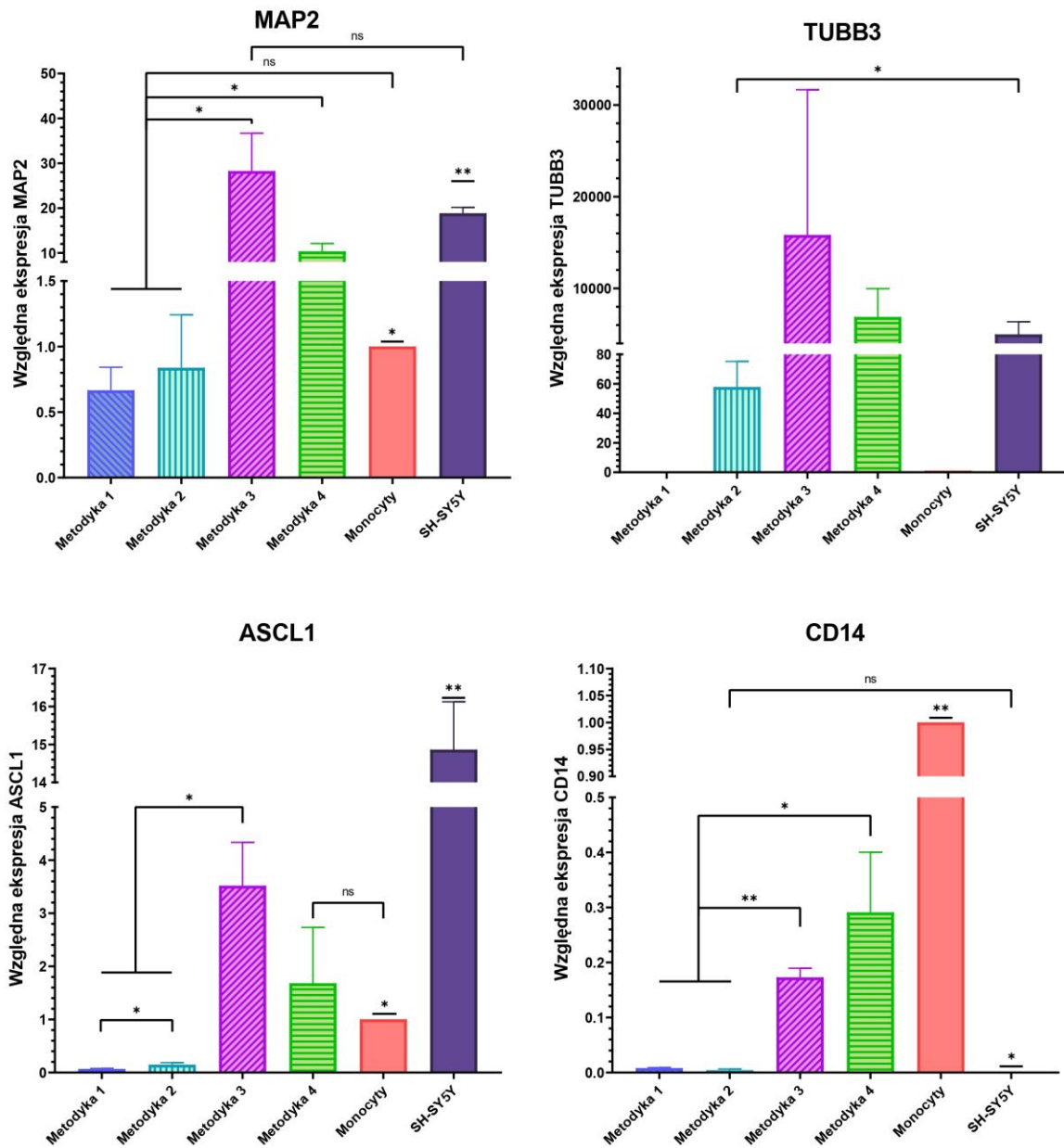


**Ryc. 27. Poziom ekspresji genów neuronalnych i CD14 dla komórek uzyskanych w wyniku przeprowadzenia połowy etapu dojrzewania testowanych metodyk transdiferencjacji**

Poziom ekspresji ustalony względem monocytów; \**p-value* < 0,05; \*\**p-value* <0,005; \*\*\**pvalue* < 0,0005; ns - brak statystycznie istotnej różnicy;

#### 4.6.3. Komórki transróżnicowane

Wydłużenie czasu inkubacji komórek w mediach dojrzewających wpłynęło na poziomy ekspresji badanych genów (Ryc. 28). Zaobserwowano zwiększenie ekspresji analizowanych genów neuronalnych dla komórek uzyskanych w wyniku przeprowadzenia metodyki 3 i metodyki 4. Poziom ekspresji genu MAP2 dla KIM1 i KIM2 był istotnie niższy ( $p < 0,05$ ) niż dla KIM3 i KIM4 oraz był porównywalny do poziomu ekspresji dla monocytów. Obserwując ekspresję genu TUBB3, nie udało się wykryć ekspresji dla KIM1, jednak ekspresja dla KIM3 i KIM4 pozostała zbliżona do ekspresji dla SH-SY5Y. Analogicznie do poprzedniego etapu, KIM3 charakteryzowały się istotnie wyższym poziomem ekspresji ASCL1 ( $p < 0,05$ ) w porównaniu do komórek uzyskanych z zastosowaniem metodyki 1 i metodyki 2. Poziom ekspresji CD14 dla KIM2 uległ zmniejszeniu do poziomu porównywalnego dla SH-SY5Y i był istotnie niższy w porównaniu do KIM3 ( $p < 0,005$ ) i KIM4 ( $p < 0,05$ ). Podobnie KIM1 wykazywały niższy poziom ekspresji CD14 w porównaniu do KIM3 ( $p < 0,005$ ) i KIM4 ( $p < 0,05$ ).

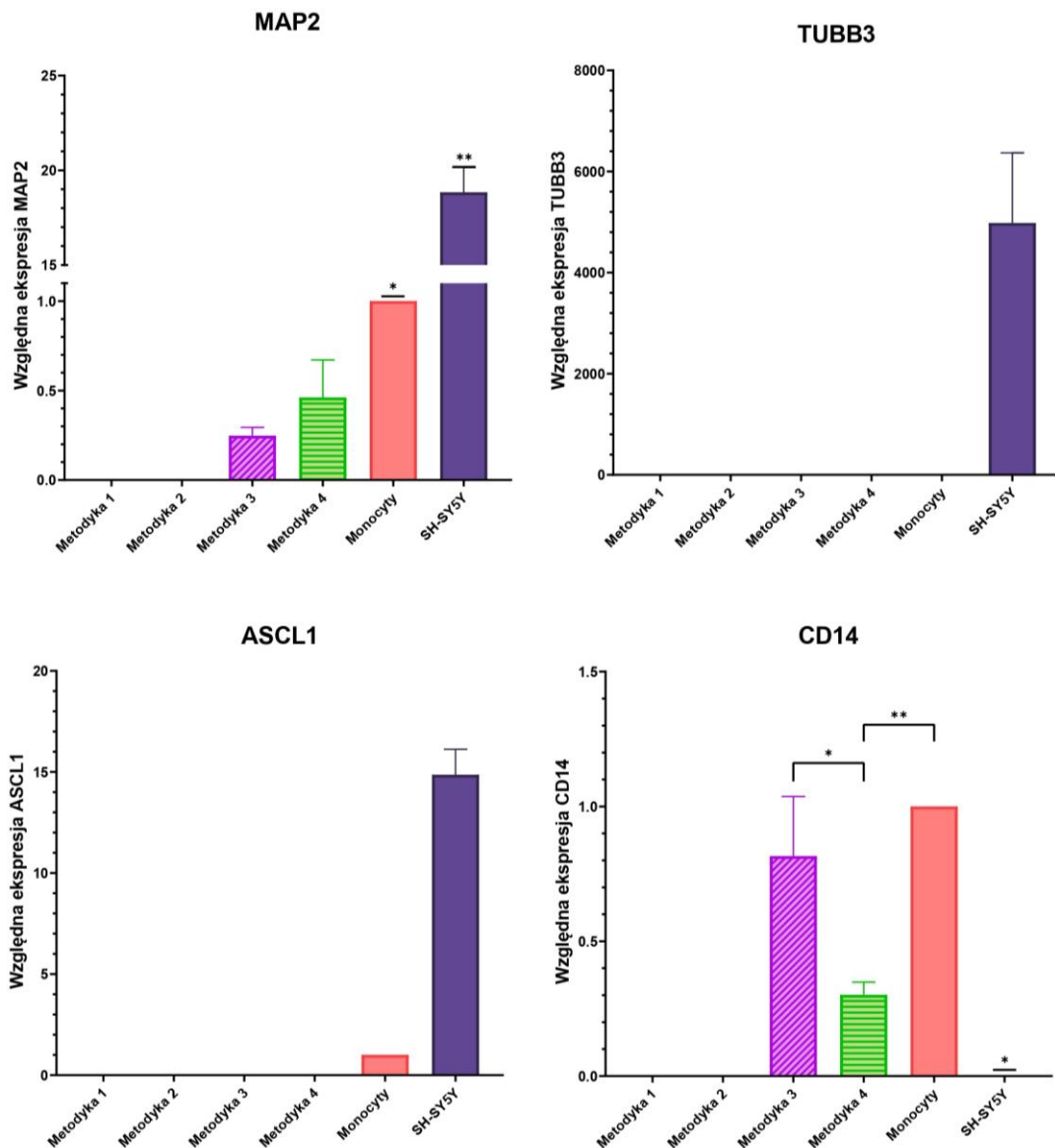


**Ryc. 28. Poziom ekspresji genów neuronalnych i CD14 dla komórek uzyskanych w wyniku przeprowadzenia testowanych metodyk transdiferencjacji**

Poziom ekspresji ustalony względem monocytów; \**p-value* < 0,05; \*\**p-value* < 0,005; ns - brak statystycznie istotnej różnicy;

#### 4.6.4. Hodowla

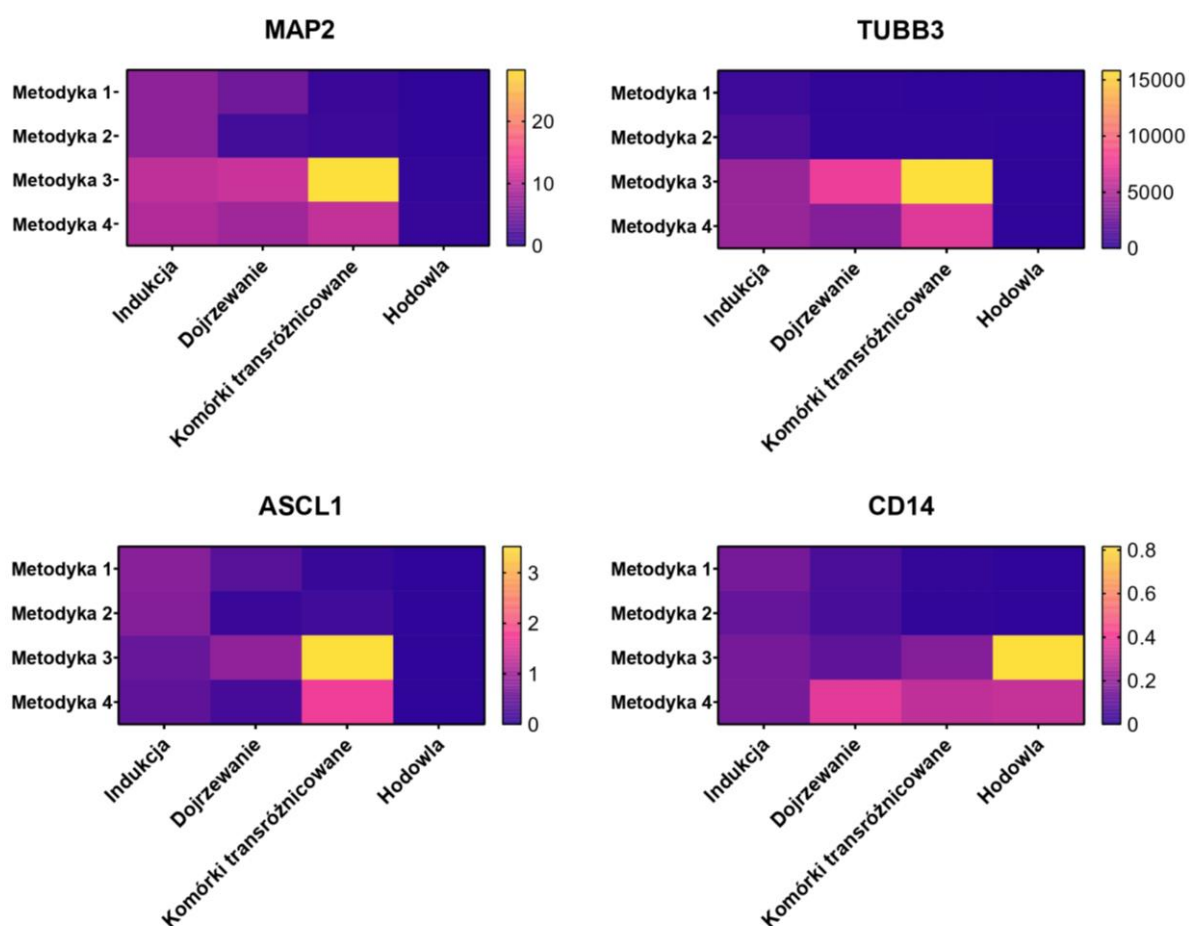
Brak obecności SM w medium hodowlanym spowodował drastyczny spadek poziomu ekspresji genów neuronalnych dla komórek uzyskanych wszystkimi testowanymi metodykami (Ryc. 29). Poziom ekspresji MAP2 komórek hodowanych zgodnie z metodyką 3 i metodyką 4 był mniejszy od poziomu obserwowanego dla monocytów ( $p < 0,05$ ). Dla komórek hodowanych zgodnie z metodyką 1 i metodyką 2, nie wykryto ekspresji MAP2. Nie wykryto również ekspresji dla genów ASCL1 i TUBB3 dla wszystkich analizowanych komórek. Przeciwnie ekspresja genu CD14 dla KIM3 wzrosła do poziomu porównywalnego dla monocytów i była istotnie wyższa ( $p < 0,05$ ) od poziomu ekspresji dla KIM4.



**Ryc. 29. Poziom ekspresji genów neuronalnych i CD14 dla komórek indukowanych, hodowanych w medium bez dodatku małych molekuł**  
Poziom ekspresji ustalony względem monocytów; \* $p$ -value < 0,05; \*\* $p$ -value < 0,005;

#### 4.6.5. Zestawienie ekspresji poszczególnych genów na wszystkich etapach przeprowadzonych metodyk transdiferencjacji monocytów, w komórki neuronalne

Zaobserwowano, że ekspresja genów neuronalnych wzrastała wraz z postępującym przeprowadzaniem metodyki 3 i metodyki 4 oraz osiągnęła najwyższy poziom dla komórek indukowanych metodyką 3 (Ryc. 30). Przeciwnie, dla komórek indukowanych metodyką 1 i metodyką 2 poziom ekspresji genów neuronalnych ulegał zmniejszeniu. W przypadku genu CD14 najwyższy poziom ekspresji został wykryty po hodowli w MN dla KIM3. Dodatkowo zaobserwowano, że najniższy poziom ekspresji CD14 odnotowano dla KIM1 i KIM2 na tych samych etapach transdiferencjacji, na których wykazywały najniższy poziom ekspresji genów neuronalnych.



Ryc. 30. Poziomy ekspresji genów neuronalnych i CD14 na wszystkich etapach przeprowadzonych metodyk transdiferencjacji

## 5. Dyskusja

Choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroba Alzheimera, Parkinsona czy też Huntingtona istotnie redukcją jakość życia pacjentów, poprzez zaburzenia funkcji poznawczych i motorycznych [91]. Pomimo ciągle prowadzonych badań w obszarze neurologii, opcje terapeutyczne dla pacjentów ograniczone są głównie do terapii łagodzących objawy choroby. Przyczyną występowania trudności w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych jest m.in. ograniczona zdolność regeneracji dorosłego mózgu, w wyniku czego większość uszkodzeń tej struktury jest nieodwracalna. Dodatkowo przyczynia się to do trudności w pozyskiwaniu funkcjonalnych neuronów, które mogą być wykorzystywane w badaniach laboratoryjnych, w celu modelowania chorób, w testach cytotoksyczności produktów medycznych, czy też jako bezpośredni materiał w terapii komórkowej [92, 93]. Uwzględniając przedstawione czynniki, opracowanie nowego źródła pozyskiwania komórek neuronalnych wydaje się idealnym rozwiązaniem dla istotnych ograniczeń, jakimi obarczona jest współczesna neurologia.

Jednym z obiecujących i innowacyjnych źródeł pozyskiwania komórek neuronalnych jest zastosowanie procesu transdiferencjacji. Proces umożliwia wytworzenie komórek neuronalnych z innych, już zróżnicowanych komórek, np. z fibroblastów [94]. Początkowo w tym celu stosowano techniki modyfikacji genetycznych, takich jak dostarczanie do komórek wyjściowych czynników transkrypcyjnych, czy też mikroRNA. Opracowywane procedury umożliwiały pozyskanie komórek neuronalnych z fibroblastów czy też astrocytów [1, 34]. Natomiast zastosowanie wspomnianych metod genetycznych ograniczało możliwości wykorzystania uzyskanych komórek do warunków laboratoryjnych, ze względu na ryzyko powstania mutacji genetycznych. Rozwiązaniem tego problemu okazała się technika transdiferencjacji chemicznej, która umożliwia pozyskanie komórek neuronalnych bezpieczniejszych do zastosowania w celach klinicznych. Proces chemicznego transróżnicowania indukowany jest poprzez wzbogacenie medium hodowlanych koktajlem małych molekuł. Ich działanie polega m.in. na indukcji ekspresji genów neuronalnych i wyciszeniu ekspresji genów odpowiedzialnych za genotyp komórek wyjściowych. Należy jednak mieć na uwadze, że pełen mechanizm działania SM w dalszym ciągu nie jest dobrze poznany [46, 95]. Wraz z opracowywaniem kolejnych metodyk chemicznej transdiferencjacji zaobserwowano istotne pod praktycznym aspektem atuty tej techniki. Jednym z nich jest niższy koszt



przeprowadzenia procedury, wynikający z braku konieczności stosowania dodatkowych technik dostarczania czynników transkrypcyjnych czy mikroRNA do wnętrza komórek. Kolejnym atutem jest łatwość wykonania procedury. Umożliwia to zastosowanie metody transróżnicowania przez szerszą grupę badaczy, którzy nie specjalizują się w dziedzinie inżynierii komórkowej i genetycznej [96, 97]. Uwzględniając opisane cechy, proces chemicznej transdyferencji wydaje się idealnym źródłem pozyskiwania komórek neuronalnych do celów badawczych, jak i klinicznych, dlatego opracowanie efektywnej metodyki jest niezwykle istotne dla rozwoju obecnej neurologii.

Pomimo szeregu przeprowadzonych badań, metodyki transdyferencji chemicznej nie pozostają pozbawione wad, takich jak umiarkowana wydajność czy czasochłonność. Dodatkowo większość procedur, wykorzystuje jako komórki wyjściowe fibroblasty i astrocycy, których pozyskanie wymusza zastosowanie inwazyjnych technik, takich jak biopsja [22, 24]. Ponadto zastosowanie wspomnianych linii komórkowych wymaga wstępnego rozchodowania, aby osiągnąć odpowiednią ilość komórek do przeprowadzenia procesu transdyferencji, zwiększając czas i koszt całej procedury. W odpowiedzi na ten problem Ninomiya i wsp. [27] opracowali metodykę chemicznej transdyferencji, w której stosunkowo łatwe do pozyskania komórki zostały przekształcone w komórki neuronalne w już 3 dni. Komórkami wyjściowymi w ich pracy były monocyty, czyli jednojądrzaste komórki mieloidalne. Dzięki temu, że komórki krążą w krwiobiegu, są łatwo pozyskiwane, poprzez standardowo wykonywaną procedurę pobrania krwi [98]. Stworzona metodyka wydaje się bardzo obiecująca, ze względu na krótki czas trwania, łatwość pozyskiwania komórek wyjściowych oraz stosunkowo niski koszt przeprowadzenia procedury. Natomiast uzyskane przez nich komórki nie wykazywały cech dojrzałych neuronów. Dodatkowo zespół badawczy nie określił, czy komórki utrzymują swój nowy genotyp bez bezpośredniego wpływu SM. Pomimo wad występujących w pracy przeprowadzonej przez Ninomiya i wsp., badanie dostarczyło nowych informacji na temat transróżnicowania neuronalnego monocytów, które stanowią źródło inspiracji do dalszego doskonalenia metodyki.

SM stosowane w mediach indukujących i dojrzewających zostały wyselekcjonowane, tak, aby zastosowanie ich koktajli wykazywało duże prawdopodobieństwo zajścia procesu transróżnicowania. W tym celu użyto standardowo stosowanych modulatorów szlaków TGF- $\beta$ , WNT, RAR, ROCK, cAMP i HDAC oraz innych SM o potwierdzonym pozytywnym wpływie na proces

transróżnicowania neuronalnego. Czas inkubacji również określono wstępnie w oparciu o dostępne metodyki [24, 27, 85, 99–101], jednak ulegał on modyfikacji na podstawie obserwacji morfologii komórek w prowadzonej hodowli. Odpowiednie warunki hodowlane dla komórek zapewniono również, poprzez pokrycie płytek poli-D-lizyną, w celu zwiększenia zdolności do proliferacji i utrzymania wyższej żywotności komórek [51].

Porównano między sobą dwa media indukujące. Mechanizm ich działania bazował na aktywacji szlaku WNT poprzez zastosowanie chir99021 i VPA, aktywacji cAMP przez forskolinę oraz inhibicji ROCK za pomocą Y-27632. Zaobserwowano, że często w mediach indukujących stosuje się kilka SM, które zwiększają aktywność szlaku WNT, ponieważ wykazują one działanie synergiczne. Dlatego w medium indukującym I, efekt aktywacji szlaku WNT był dodatkowo zwiększony przez RepSox i dorsomorfinę. Natomiast w medium indukującym II wspomniany efekt był zwiększony przez A8301 i NaB [102]. Ponadto NaB, pełnił funkcje neuroprotekcijną, poprzez modulację ekspresji HO-1 i NOX4, zmniejszając powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS – ang. *reactive oxygen species*) [103, 104]. Dodatkowo zastosowanie TTNPB w MI II umożliwiło sprawdzenie stymulującego wpływu bezpośredniej aktywacji szlaku RAR na transróżnicowanie neuronalne monocytów.

W wyniku zastosowania medium indukującego II uzyskano komórki o wyższym poziomie ekspresji genów neuronalnych MAP i TUBB3 w porównaniu do komórek indukowanych MI I. Natomiast poziom ekspresji genu ASCL1 był wyższy dla komórek indukowanych IM I. Aktywacja genów neuronalnych nie znalazła jednak odzwierciedlenia w translacji, ponieważ nie wykryto sygnału dla markerów neuronalnych podczas barwienia immunofluorescencyjnego. Sugeruje to, że zachodzące na tym etapie procesu transdiferencjacji zmiany, zachodziły na poziomie genetycznym. Inicjacje procesu transróżnicowania potwierdziła również istotnie zmniejszona ekspresja genu CD14, która w normalnych warunkach wykazuje bardzo wysoki poziom dla monocytów [26]. Pomimo obserwowanego spadku ekspresji, komórki pozostały CD14-pozytywne w barwieniu immunofluorescencyjnym. Uwzględniając poziomy ekspresji badanych genów, indukcja procesu transdiferencjacji neuronalnej z zastosowaniem MI II wydaje się bardziej efektywna. Zaobserwowana różnica może również wskazywać na stymulujący efekt bezpośredniej aktywacji szlaku RAR na proces transróżnicowania monocytów. Dodatkowo wyższa ekspresja genu ASCL1 – markera wczesnych progenitorów neuronalnych [105, 106] dla komórek indukowanym

MI I w porównaniu do komórek traktowanych MI II wskazuje na różnice występujące w mechanizmie działania badanych koktajli małych molekuł.

W celu przeprowadzenia komórek przez dalsze etapy procesu transróżnicowania zastosowano trzy formuły mediów dojrzewających. Czynniki wspólnymi dla wszystkich mediów był dodatek chir99021, w ramach aktywacji szlaku WNT oraz forskolina zwiększająca aktywność cAMP. Dodatkowo MD I było wzbogacone inhibitorem ROCK (Y-27632) i innymi czynnikami aktywującymi WNT (RepSox, dorsomorfina). Podobnie skład MD III uzupełniono dodatkiem Y-27632, ale wprowadzono również czynnik bezpośrednio aktywujący szlak RAR (TTNPB), egzogenny cAMP i A83-01 (aktywator szlaku WNT). Najmniejszą ilość dodatku SM (chir99021, forskolina, dorsomorfina) zastosowano w MD II. Miało to na celu sprawdzenie, czy wyłącznie aktywacja szlaku WNT i zwiększona aktywność cAMP umożliwią pozyskanie dojrzałych neuronów z monocytów. Na etapie dojrzewania zrezygnowano z dodatków VPA i NaB, ponieważ odnotowano, że wydłużony czas ich inkubacji z komórkami przyczynia się do zwiększenia śmiertelności komórek [99]. Dodatkowo ze względu na przechodzenie z metabolizmu glikolitycznego na większy metabolizm oksydacyjnej fosforylacji (OxPhos), w trakcie transróżnicowania, konieczny był dodatek innego antyoksydantu. Miało to na celu ochronę komórek przed powstającymi ROS, które indukują apoptozę [24, 107]. W tym celu MD I i MD III wzbogacono dodatkiem witaminy C.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że metodyka 1 i metodyka 2 nie umożliwiły efektywnego przeprowadzenia procesu transróżnicowania. Stwierdzenie zostało sformułowane opierając się na wynikach analizy genetycznej. Poziom ekspresji badanych genów neuronalnych był porównywalny do ekspresji występującej dla monocytów. Zostało to również potwierdzone na poziomie białkowym. Nie wykryto sygnałów fluorescencyjnych dla badanych białek neuronalnych. Biorąc pod uwagę, stosowane SM w mediach metodyki 1, można wywnioskować, że aktywacja szlaku WNT, zwiększona aktywność cAMP i inhibicja ROCK nie są wystarczające, aby przeprowadzić proces transróżnicowania monocytów w neurony. Dodatkowo potwierdza to nieefektywna transdyferencjacja przeprowadzona z zastosowaniem metodyki 2, która również w całości bazowała na modulacji aktywności podanych szlaków.

W wyniku przeprowadzenia transdyferencjacji z zastosowaniem metodyki 3 i metodyki 4 udało się uzyskać komórki z poziomem ekspresji TUBB3 zbliżonym do

kontroli pozytywnej (SH-SY5Y). Dodatkowo nowo pozyskany przez komórki genotyp, został potwierdzony w barwieniu immunofluorescencyjnym, gdzie wykryto obecność białka cytoszkieletu  $\beta$ -III tubuliny (TUJ1) i białka związanego z mikrotubulami 2 (MAP2). Ponadto stwierdzono, że uzyskane neurony uformowały synapsy, dzięki wykryciu białka synaptofizyny (SYP), wskazując na dojrzały charakter wytworzonych komórek [108]. Biorąc pod uwagę, że zarówno dla metodyki 2 i metodyki 4 stosowano to samo medium dojrzewające (MD II), a przeprowadzenie tylko metodyki 4 umożliwiło pozyskanie komórek neuronalnych, stwierdzono, że bezpośrednia aktywacja szlaku RAR, jest niezwykle istotna w procesie indukcji transróżnicowania monocytów w komórki neuronalne i znacząco wpływa na efektywność dalszej procedury. Zaobserwowano, że zachowanie TTNPB, dostarczenie egzogenego cAMP i inhibicja ROCK w MD III umożliwiła uzyskanie komórek o bardziej zdefiniowanym genotypie neuronalnym, ponieważ wykazywały najwyższy poziom ekspresji badanych genów neuronalnych. Ponadto nie zaobserwowano znacznych różnic w żywotności, pomiędzy komórkami traktowanymi metodyką 3 i metodyką 4. Fakt umożliwia wywnioskowanie, że dodatek witaminy C nie wpływa istotnie na żywotność komórek w trakcie procesu transróżnicowania.

Pozbawienie pozyskanych w wyniku transdyferencjacji komórek neuronalnych bezpośredniego wpływu SM spowodowało drastyczne zmniejszenie poziomu ekspresji badanych genów neuronalnych. Analogicznie nie zaobserwowano obecności TUJ1 i MAP2 w wyniku barwienia immunofluorescencyjnego, pomimo nieznacznych różnic w morfologii komórek. Uzyskane wyniki mogą świadczyć o niestabilności nowego genotypu pozyskanego przez indukowane komórki i ujawnia konieczność lepszego poznania i zrozumienia mechanizmu zachodzenia transróżnicowania.

Reasumując, zarówno metodyka 3 i metodyka 4 umożliwiła przeprowadzenie procesu transdyferencjacji monocytów w komórki neuronalne TUJ1+ MAP2+, które cechują się obecnością synaps. Obie procedury wymagały 17 dni w celu indukcji komórek neuronalnych, plasując się w średnim czasie potrzebnym na pozyskanie neuronów z innych komórek wyjściowych z zastosowaniem SM [22, 24, 44, 45, 85]. Nakład finansowy potrzebny do przeprowadzenia tych procedur był niewiele wyższy dla metodyki 3, ze względu na większą ilość stosowanych małych molekuł przez cały okres eksperymentu. Biorąc jednak pod uwagę genotyp, metodyka 3 umożliwiła otrzymanie komórek o lepiej zdefiniowanych cechach neuronalnych (wyższy poziom ekspresji TUBB3, MAP2 i ASCL1), czyniąc ją bardziej efektywną. Dodatkowo

przeprowadzona analiza ujawnia istotny wpływ TTNPB (analogu RA) na efektywność procesu transróżnicowania monocytów. Stwierdzony efekt był już obserwowany w procesie neuronalnego różnicowania komórek macierzystych [109–111]. W dalszych postęпах nad opracowaniem optymalnej metodyki transdyferencji monocytów w neurony należy poszerzyć badanie o określenie funkcjonalności pozyskiwanych komórek. Dodatkowo, w celu zwiększenia stabilności nowo pozyskanego genotypu warto przetestować inne inhibitory HDAC, np. worinostat czy trichostatynę A, oraz inhibitory metylacji DNA, takie jak zebularina i RG108.

Uzyskane wyniki wykazują, że najbardziej optymalną procedurą transdyferencji monocytów w neurony jest opracowana metodyka 3. Składała się ona z etapu indukcji, podczas którego monocyty traktowane były koktajlem małych molekuł indukujących szlak WNT (chir99021, A83-01, NaB), cAMP (forskolina) i RAR (TTNPB) oraz zmniejszających aktywność ROCK (Y-27632) i HDAC (VPA). Następnie medium zastało wymienione na medium dojrzewające, które wciąż stymulowało proces różnicowania, jednak dostarczało dodatkowych czynników neuroprotekcyjnych (cAMP, witamina C) i umożliwiających formowanie synaps (Y-27632) oraz zostało pozbawione SM, które mogłyby zwiększyć śmiertelność komórek (VPA i NaB). Jest to jedna z niewielu opracowanych metodyk neuronalnego transróżnicowania monocytów.

Dodatkowo przeprowadzone analizy umożliwiły po raz pierwszy stwierdzenie, że aktywacja bezpośrednia szlaku RAR istotnie zwiększa efektywność indukcji neuronalnej transdyferencji monocytów i umożliwia pozyskanie komórek o lepiej zdefiniowanym genotypie neuronalnym.

## **6. Wnioski**

Niniejsza praca umożliwiła opracowanie metodyki przeprowadzenia procesu transdiferencjacji monocytów w neurony z zastosowaniem koktajli małych molekuł składających się z chir99021, forskoliny, Y-27632, VPA, A83-01, TTNPB, NaB, cAMP i witaminy C.

Ponadto określono szczególną wartość bezpośredniej aktywacji szlaku RAR jako niezbędnego elementu do efektywnego zajścia neuronalnej transdiferencjacji monocytów.

## 7. Piśmiennictwo

1. Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Südhof, T. C., & Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, *463*(7284), 1035–1041. <https://doi.org/10.1038/nature08797>
2. Handy, D. E., Castro, R., & Loscalzo, J. (2011). Epigenetic Modifications: Basic Mechanisms and Role in Cardiovascular Disease. *Circulation*, *123*(19), 2145–2156. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.956839>
3. Kiselev, I. S., Kulakova, O. G., Boyko, A. N., & Favorova, O. O. (2021). DNA Methylation As an Epigenetic Mechanism in the Development of Multiple Sclerosis. *Acta Naturae*, *13*(2), 45–57. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11043>
4. Yamanaka, S. (2009). Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature*, *460*(7251), 49–52. <https://doi.org/10.1038/nature08180>
5. Rezaei-Lotfi, S., Vujovic, F., Simonian, M., Hunter, N., & Farahani, R. M. (2021). Programmed genomic instability regulates neural transdifferentiation of human brain microvascular pericytes. *Genome Biology*, *22*, 334. <https://doi.org/10.1186/s13059-021-02555-0>
6. Pfisterer, U., Kirkeby, A., Torper, O., Wood, J., Nelander, J., Dufour, A., Björklund, A., Lindvall, O., Jakobsson, J., & Parmar, M. (2011). Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(25), 10343–10348. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105135108>
7. Pang, Z. P., Yang, N., Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Fuentes, D. R., Yang, T. Q., Citri, A., Sebastiano, V., Marro, S., Südhof, T. C., & Wernig, M. (2011). Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature*, *476*(7359), 220–223. <https://doi.org/10.1038/nature10202>
8. Wang, H., Yang, Y., Liu, J., & Qian, L. (2021). Direct cell reprogramming: Approaches, mechanisms and progress. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *22*(6), 410–424. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00335-z>
9. Latchman, D. S. (1997). Transcription factors: An overview. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *29*(12), 1305–1312. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(97\)00085-x](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(97)00085-x)
10. Ghosh, N., Santoni, D., Saha, I., & Felici, G. (2024). Predicting Transcription Factor Binding Sites with Deep Learning. *International Journal of Molecular Sciences*, *25*(9), 4990. <https://doi.org/10.3390/ijms25094990>
11. Herdy, J., Schafer, S., Kim, Y., Ansari, Z., Zangwill, D., Ku, M., Paquola, A., Lee, H., Mertens, J., & Gage, F. H. (2019). Chemical modulation of transcriptionally enriched signaling pathways to optimize the conversion of fibroblasts into neurons. *eLife*, *8*, e41356. <https://doi.org/10.7554/eLife.41356>

12. Wei, D. C., & Morrison, E. H. (2024). Histology, Astrocytes. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545142/>
13. Vasan, L., Park, E., David, L. A., Fleming, T., & Schuurmans, C. (2021). Direct Neuronal Reprogramming: Bridging the Gap Between Basic Science and Clinical Application. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 681087. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.681087>
14. Berninger, B., Costa, M. R., Koch, U., Schroeder, T., Sutor, B., Grothe, B., & Götz, M. (2007). Functional Properties of Neurons Derived from In Vitro Reprogrammed Postnatal Astroglia. *The Journal of Neuroscience*, *27*(32), 8654–8664. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1615-07.2007>
15. Sharif, A., & Prevot, V. (2012). Isolation and culture of human astrocytes. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *814*, 137–151. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0_11)
16. Caiazzo, M., Dell'Anno, M. T., Dvoretzkova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., Sotnikova, T. D., Menegon, A., Roncaglia, P., Colciago, G., Russo, G., Carninci, P., Pezzoli, G., Gainetdinov, R. R., Gustincich, S., Dityatev, A., & Broccoli, V. (2011). Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature*, *476*(7359), 224–227. <https://doi.org/10.1038/nature10284>
17. Ambasudhan, R., Talantova, M., Coleman, R., Yuan, X., Zhu, S., Lipton, S. A., & Ding, S. (2011). Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell Stem Cell*, *9*(2), 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.07.002>
18. Yang, Y., Chen, R., Wu, X., Zhao, Y., Fan, Y., Xiao, Z., Han, J., Sun, L., Wang, X., & Dai, J. (2019). Rapid and Efficient Conversion of Human Fibroblasts into Functional Neurons by Small Molecules. *Stem Cell Reports*, *13*(5), 862–876. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.09.007>
19. Sorraksa, N., Kaokaen, P., Kunhorm, P., Heebkaew, N., Promjantuek, W., & Noisa, P. (2024). Rapid induction of dopaminergic neuron-like cells from human fibroblasts by autophagy activation with only 2-small molecules. *3 Biotech*, *14*(4), 115. <https://doi.org/10.1007/s13205-024-03957-0>
20. Plikus, M. V., Wang, X., Sinha, S., Forte, E., Thompson, S. M., Herzog, E. L., Driskell, R. R., Rosenthal, N., Biernaskie, J., & Horsley, V. (2021). Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell*, *184*(15), 3852–3872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.024>
21. Fernandes, G. S., Singh, R. D., De, D., & Kim, K. K. (2023). Strategic Application of Epigenetic Regulators for Efficient Neuronal Reprogramming of Human Fibroblasts. *International Journal of Stem Cells*, *16*(2), 156–167. <https://doi.org/10.15283/ijsc22183>
22. Tanabe, K., Ang, C. E., Chanda, S., Olmos, V. H., Haag, D., Levinson, D. F., Südhof, T. C., & Wernig, M. (2018). Transdifferentiation of human adult peripheral blood T cells into neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(12), 6245–6250. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718811115>



*Sciences of the United States of America*, 115(25), 6470–6475.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1720273115>

23. Liu, D., Rychkov, G., Al-Hawwas, M., Manaph, N. P. A., Zhou, F., Bobrovskaya, L., Liao, H., & Zhou, X.-F. (2020). Conversion of human urine-derived cells into neuron-like cells by small molecules. *Molecular Biology Reports*, 47(4), 2713–2722. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05370-1>
24. Xu, G., Wu, F., Gu, X., Zhang, J., You, K., Chen, Y., Getachew, A., Zhuang, Y., Zhong, X., Lin, Z., Guo, D., Yang, F., Pan, T., Wei, H., & Li, Y. (2019). Direct Conversion of Human Urine Cells to Neurons by Small Molecules. *Scientific Reports*, 9, 16707. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53007-6>
25. Zhang, S.-Z., Ma, L.-X., Qian, W.-J., Li, H.-F., Wang, Z.-F., Wang, H.-X., & Wu, Z.-Y. (2016). Modeling Neurological Disease by Rapid Conversion of Human Urine Cells into Functional Neurons. *Stem Cells International*, 2016, 2452985. <https://doi.org/10.1155/2016/2452985>
26. Bellon, A., Wegener, A., Lescallete, A. R., Valente, M., Yang, S.-K., Gardette, R., Matricon, J., Mouaffak, F., Watts, P., Vimeux, L., Yun, J. K., Kawasawa, Y. I., Clawson, G. A., Blandin, E., Chaumette, B., Jay, T. M., Krebs, M.-O., Feuillet, V., & Hosmalin, A. (2018). Transdifferentiation of Human Circulating Monocytes Into Neuronal-Like Cells in 20 Days and Without Reprogramming. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 323. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00323>
27. Ninomiya, I., Kanazawa, M., Koyama, A., Hatakeyama, M., & Onodera, O. (2019). *Highly efficient direct conversion of human monocytes into neuronal cells using a small molecule combination*. <https://doi.org/10.1101/803254>
28. Pirona, A. C., Oktriani, R., Boettcher, M., & Hoheisel, J. D. (2020). Process for an efficient lentiviral cell transduction. *Biology Methods & Protocols*, 5(1), bpaa005. <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpaa005>
29. Pulcrano, S., De Gregorio, R., De Sanctis, C., Volpicelli, F., Piscitelli, R. M., Speranza, L., Perrone-Capano, C., di Porzio, U., Caiazzo, M., Martini, A., Giacomet, C., Medina, D., Awatramani, R., Viggiano, D., Federici, M., Mercuri, N. B., Guatteo, E., & Bellenchi, G. C. (2023). miR-218 Promotes Dopaminergic Differentiation and Controls Neuron Excitability and Neurotransmitter Release through the Regulation of a Synaptic-Related Genes Network. *The Journal of Neuroscience*, 43(48), 8104–8125. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0431-23.2023>
30. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
31. Wang, S., Xu, J., Guo, Y., Cai, Y., Zhu, W., Meng, L., Jiang, C., & Lu, S. (2023). Successful Transfection of MicroRNA Mimics or Inhibitors in a Regular Cell Line and in Primary Cells Derived from Patients with Rheumatoid Arthritis. *Bio-Protocol*, 13(18), e4823. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4823>

32. Alexanian, A. R., Liu, Q., & Zhang, Z. (2013). Enhancing the efficiency of direct reprogramming of human mesenchymal stem cells into mature neuronal-like cells with the combination of small molecule modulators of chromatin modifying enzymes, SMAD signaling and cyclic adenosine monophosphate levels. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *45*(8), 1633–1638. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.04.022>
33. Tan, Z., Qin, S., Liu, H., Huang, X., Pu, Y., He, C., Yuan, Y., & Su, Z. (2023). Small molecules reprogram reactive astrocytes into neuronal cells in the injured adult spinal cord. *Journal of Advanced Research*, *59*, 111–127. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2023.06.013>
34. Han, J. Y., Lee, E.-H., Kim, S.-M., & Park, C.-H. (2023). Efficient Generation of Dopaminergic Neurons from Mouse Ventral Midbrain Astrocytes. *Biomolecules & Therapeutics*, *31*(3), 264–275. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2022.140>
35. Vadodaria, K. C., Mertens, J., Paquola, A., Bardy, C., Li, X., Jappelli, R., Fung, L., Marchetto, M. C., Hamm, M., Gorris, M., Koch, P., & Gage, F. H. (2016). Generation of functional human serotonergic neurons from fibroblasts. *Molecular Psychiatry*, *21*(1), 49–61. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.161>
36. Shi, Z., Zhang, J., Chen, S., Li, Y., Lei, X., Qiao, H., Zhu, Q., Hu, B., Zhou, Q., & Jiao, J. (2016). Conversion of Fibroblasts to Parvalbumin Neurons by One Transcription Factor, *Ascl1*, and the Chemical Compound Forskolin. *The Journal of Biological Chemistry*, *291*(26), 13560–13570. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.709808>
37. Li, B., Jiang, H., Li, H., Zhang, B., Slaughter, M., Yan, Z., & Feng, J. (2021). Direct conversion of adult human retinal pigmented epithelium cells to neurons with photoreceptor properties. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, *246*(2), 240–248. <https://doi.org/10.1177/1535370220963755>
38. Huh, C. J., Zhang, B., Victor, M. B., Dahiya, S., Batista, L. F., Horvath, S., & Yoo, A. S. (n.d.). Maintenance of age in human neurons generated by microRNA-based neuronal conversion of fibroblasts. *eLife*, *5*, e18648. <https://doi.org/10.7554/eLife.18648>
39. Xue, Y., Ouyang, K., Huang, J., Zhou, Y., Ouyang, H., Li, H., Wang, G., Wu, Q., Wei, C., Bi, Y., Jiang, L., Cai, Z., Sun, H., Zhang, K., Zhang, Y., Chen, J., & Fu, X.-D. (2013). Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated microRNA circuits. *Cell*, *152*(1–2), 82–96. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.045>
40. Yoo, A. S., Sun, A. X., Li, L., Shcheglovitov, A., Portmann, T., Li, Y., Lee-Messer, C., Dolmetsch, R. E., Tsien, R. W., & Crabtree, G. R. (2011). MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature*, *476*(7359), 228–231. <https://doi.org/10.1038/nature10323>
41. Ma, N.-X., Yin, J.-C., & Chen, G. (2019). Transcriptome Analysis of Small Molecule-Mediated Astrocyte-to-Neuron Reprogramming. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *7*, 82. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00082>

42. Gao, L., Guan, W., Wang, M., Wang, H., Yu, J., Liu, Q., Qiu, B., Yu, Y., Ping, Y., Bian, X., Shen, L., & Pei, G. (2017). Direct Generation of Human Neuronal Cells from Adult Astrocytes by Small Molecules. *Stem Cell Reports*, 8(3), 538. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.01.014>
43. Zhao, A.-D., Qin, H., Sun, M.-L., Ma, K., & Fu, X.-B. (2020). Efficient and rapid conversion of human astrocytes and ALS mouse model spinal cord astrocytes into motor neuron-like cells by defined small molecules. *Military Medical Research*, 7(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00271-7>
44. Qin, H., Zhao, A.-D., Sun, M.-L., Ma, K., & Fu, X.-B. (2020). Direct conversion of human fibroblasts into dopaminergic neuron-like cells using small molecules and protein factors. *Military Medical Research*, 7, 52. <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00284-2>
45. Yang, J., Cao, H., Guo, S., Zhu, H., Tao, H., Zhang, L., Chen, Z., Sun, T., Chi, S., & Hu, Q. (2020). Small molecular compounds efficiently convert human fibroblasts directly into neurons. *Molecular Medicine Reports*, 22(6), 4763–4771. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11559>
46. Lee, J., Taylor, C. A., Barnes, K. M., Shen, A., Stewart, E. V., Chen, A., Xiang, Y. K., Bao, Z., & Shen, K. (n.d.). A Myt1 family transcription factor defines neuronal fate by repressing non-neuronal genes. *eLife*, 8, e46703. <https://doi.org/10.7554/eLife.46703>
47. Mertsch, S., & Krämer, O. H. (2017). The interplay between histone deacetylases and rho kinases is important for cancer and neurodegeneration. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 37, 29–45. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2017.05.006>
48. Wei, Z., Sakamuru, S., Zhang, L., Zhao, J., Huang, R., Kleinstreuer, N. C., Chen, Y., Shu, Y., Knudsen, T. B., & Xia, M. (2019). Identification and Profiling of Environmental Chemicals That Inhibit the TGF $\beta$ /SMAD Signaling Pathway. *Chemical Research in Toxicology*, 32(12), 2433–2444. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00228>
49. Chen, W.-D., Chu, Y.-F., Liu, J.-J., Hong, M.-N., & Gao, P.-J. (2013). RhoA-Rho kinase signaling pathway mediates adventitial fibroblasts differentiation to myofibroblasts induced by TGF- $\beta$ 1. *Sheng Li Xue Bao: [Acta Physiologica Sinica]*, 65(2), 113–121.
50. Wang, G., Zhang, D., Qin, L., Liu, Q., Tang, W., Liu, M., Xu, F., Tang, F., Cheng, L., Mo, H., Yuan, X., Wang, Z., & Huang, B. (2024). Forskolin-driven conversion of human somatic cells into induced neurons through regulation of the cAMP-CREB1-JNK signaling. *Theranostics*, 14(4), 1701–1719. <https://doi.org/10.7150/thno.92700>
51. Aguilera-Castrejon, A., Pasantes-Morales, H., Montesinos, J. J., Cortés-Medina, L. V., Castro-Manrreza, M. E., Mayani, H., & Ramos-Mandujano, G. (2017). Improved Proliferative Capacity of NP-Like Cells Derived from Human Mesenchymal Stromal Cells and Neuronal Transdifferentiation by Small

Molecules. *Neurochemical Research*, 42(2), 415–427.  
<https://doi.org/10.1007/s11064-016-2086-7>

52. Gupta, V., Mahata, T., Roy, R., Gharai, P. K., Jana, A., Garg, S., & Ghosh, S. (2022). Discovery of imidazole-based GSK-3 $\beta$  inhibitors for transdifferentiation of human mesenchymal stem cells to neurons: A potential single-molecule neurotherapeutic foresight. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15, 1002419. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1002419>
53. Shi, C.-J., Lian, J.-J., Zhang, B.-W., Cha, J.-X., Hua, Q.-H., Pi, X.-P., Hou, Y.-J., Xie, X., & Zhang, R. (2023). TGF $\beta$ R-1/ALK5 inhibitor RepSox induces enteric glia-to-neuron transition and influences gastrointestinal motility in adult mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, 44(1), 92–104. <https://doi.org/10.1038/s41401-022-00932-4>
54. Chan, C. C. M., Wong, A. K., Liu, J., Steeves, J. D., & Tetzlaff, W. (2007). ROCK inhibition with Y27632 activates astrocytes and increases their expression of neurite growth-inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans. *Glia*, 55(4), 369–384. <https://doi.org/10.1002/glia.20466>
55. Descoteaux, M., Sunnerberg, J. P., Brady, D. D., & Staii, C. (2022). Feedback-controlled dynamics of neuronal cells on directional surfaces. *Biophysical Journal*, 121(5), 769–781. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.01.020>
56. Thompson, R., Casali, C., & Chan, C. (2019). Forskolin and IBMX Induce Neural Transdifferentiation of MSCs Through Downregulation of the NRSF. *Scientific Reports*, 9, 2969. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39544-0>
57. Yang, J., Zhu, L., Pan, H., Ueharu, H., Toda, M., Yang, Q., Hallett, S. A., Olson, L. E., & Mishina, Y. (2024). A BMP-controlled metabolic/epigenetic signaling cascade directs midfacial morphogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 134(8), e165787. <https://doi.org/10.1172/JCI165787>
58. Shi, C., Yuan, Y., Guo, Y., Jing, J., Ho, T. V., Han, X., Li, J., Feng, J., & Chai, Y. (2019). BMP Signaling in Regulating Mesenchymal Stem Cells in Incisor Homeostasis. *Journal of Dental Research*, 98(8), 904–911. <https://doi.org/10.1177/0022034519850812>
59. Kuribayashi, H., Baba, Y., & Watanabe, S. (2014). BMP signaling participates in late phase differentiation of the retina, partly via upregulation of Hey2. *Developmental Neurobiology*, 74(12), 1172–1183. <https://doi.org/10.1002/dneu.22196>
60. Kobayashi, T., Lyons, K. M., McMahon, A. P., & Kronenberg, H. M. (2005). BMP signaling stimulates cellular differentiation at multiple steps during cartilage development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), 18023–18027. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503617102>
61. Sozen, B., Demir, N., & Zernicka-Goetz, M. (2021). BMP signalling is required for extra-embryonic ectoderm development during pre-to-post-implantation

- transition of the mouse embryo. *Developmental Biology*, 470, 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.11.005>
62. Bollum, L. K., Huse, K., Oksvold, M. P., Bai, B., Hilden, V. I., Forfang, L., Yoon, S. O., Wälchli, S., Smeland, E. B., & Myklebust, J. H. (2017). BMP-7 induces apoptosis in human germinal center B cells and is influenced by TGF- $\beta$  receptor type I ALK5. *PloS One*, 12(5), e0177188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177188>
63. Kawamura, C., Kizaki, M., & Ikeda, Y. (2002). Bone morphogenetic protein (BMP)-2 induces apoptosis in human myeloma cells. *Leukemia & Lymphoma*, 43(3), 635–639. <https://doi.org/10.1080/10428190290012182>
64. Wang, L., Ma, R., Jia, G., Jian, S., Zeng, X., Xiong, Z., Li, B., & Li, C. (2022). Effect of BMP-Wnt-Nodal signal on stem cell differentiation. *Zygote (Cambridge, England)*, 30(1), 138–143. <https://doi.org/10.1017/S0967199421000447>
65. Lee, H. C., Oliveira, N. M. M., Hastings, C., Baillie-Benson, P., Moverley, A. A., Lu, H.-C., Zheng, Y., Wilby, E. L., Weil, T. T., Page, K. M., Fu, J., Moris, N., & Stern, C. D. (2024). Regulation of long-range BMP gradients and embryonic polarity by propagation of local calcium-firing activity. *Nature Communications*, 15(1), 1463. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45772-4>
66. Manzari-Tavakoli, A., Babajani, A., Farjoo, M. H., Hajinasrollah, M., Bahrami, S., & Niknejad, H. (2022). The Cross-Talks Among Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signaling and Other Prominent Pathways Involved in Neural Differentiation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.827275>
67. Wang, R. N., Green, J., Wang, Z., Deng, Y., Qiao, M., Peabody, M., Zhang, Q., Ye, J., Yan, Z., Denduluri, S., Idowu, O., Li, M., Shen, C., Hu, A., Haydon, R. C., Kang, R., Mok, J., Lee, M. J., Luu, H. L., & Shi, L. L. (2014). Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes & Diseases*, 1(1), 87–105. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2014.07.005>
68. Gurvich, N., Tsygankova, O. M., Meinkoth, J. L., & Klein, P. S. (2004). Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Cancer Research*, 64(3), 1079–1086. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-0799>
69. Chu, T., Zhou, H., Lu, L., Kong, X., Wang, T., Pan, B., & Feng, S. (2015). Valproic acid-mediated neuroprotection and neurogenesis after spinal cord injury: From mechanism to clinical potential. *Regenerative Medicine*, 10(2), 193–209. <https://doi.org/10.2217/rme.14.86>
70. Hao, Y., Creson, T., Zhang, L., Li, P., Du, F., Yuan, P., Gould, T. D., Manji, H. K., & Chen, G. (2004). Mood stabilizer valproate promotes ERK pathway-dependent cortical neuronal growth and neurogenesis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(29), 6590–6599. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5747-03.2004>

71. Janesick, A., Wu, S. C., & Blumberg, B. (2015). Retinoic acid signaling and neuronal differentiation. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 72(8), 1559–1576. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1815-9>
72. V, R., F, S., L, B., F, G., P, D., & I, L. R. (2008). Combinatorial signalling controls Neurogenin2 expression at the onset of spinal neurogenesis. *Developmental Biology*, 321(2). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.06.003>
73. Das, M., & Pethe, P. (2021). Differential expression of retinoic acid alpha and beta receptors in neuronal progenitors generated from human embryonic stem cells in response to TTNPB (a retinoic acid mimetic). *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 121, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2021.08.001>
74. Deuschl, G., Beghi, E., Fazekas, F., Varga, T., Christoforidi, K. A., Sipido, E., Bassetti, C. L., Vos, T., & Feigin, V. L. (2020). The burden of neurological diseases in Europe: An analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet. Public Health*, 5(10), e551–e567. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(20\)30190-0](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(20)30190-0)
75. Singh, S., Srivastava, A., Srivastava, P., Dhuriya, Y. K., Pandey, A., Kumar, D., & Rajpurohit, C. S. (2016). Advances in Stem Cell Research- A Ray of Hope in Better Diagnosis and Prognosis in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3, 72. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2016.00072>
76. D'Souza, G. X., Rose, S. E., Knupp, A., Nicholson, D. A., Keene, C. D., & Young, J. E. (2021). The application of in vitro-derived human neurons in neurodegenerative disease modeling. *Journal of Neuroscience Research*, 99(1), 124–140. <https://doi.org/10.1002/jnr.24615>
77. Ban, Y.-H., Park, D., Choi, E.-K., Kim, T. M., Joo, S. S., & Kim, Y.-B. (2023). Effectiveness of Combinational Treatments for Alzheimer's Disease with Human Neural Stem Cells and Microglial Cells Over-Expressing Functional Genes. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9561. <https://doi.org/10.3390/ijms24119561>
78. Zheng, X., Han, D., Liu, W., Wang, X., Pan, N., Wang, Y., & Chen, Z. (2023). Human iPSC-derived midbrain organoids functionally integrate into striatum circuits and restore motor function in a mouse model of Parkinson's disease. *Theranostics*, 13(8), 2673–2692. <https://doi.org/10.7150/thno.80271>
79. Kim, H. J., Cho, K. R., Jang, H., Lee, N. K., Jung, Y. H., Kim, J. P., Lee, J. I., Chang, J. W., Park, S., Kim, S. T., Moon, S. W., Seo, S. W., Choi, S. J., & Na, D. L. (2021). Intracerebroventricular injection of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in patients with Alzheimer's disease dementia: A phase I clinical trial. *Alzheimer's Research & Therapy*, 13(1), 154. <https://doi.org/10.1186/s13195-021-00897-2>
80. Choi, D.-H., Kim, J.-H., Kim, S. M., Kang, K., Han, D. W., & Lee, J. (2017). Therapeutic Potential of Induced Neural Stem Cells for Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 224. <https://doi.org/10.3390/ijms18010224>

81. Mu, S., Wang, J., Zhou, G., Peng, W., He, Z., Zhao, Z., Mo, C., Qu, J., & Zhang, J. (2014). Transplantation of induced pluripotent stem cells improves functional recovery in Huntington's disease rat model. *PloS One*, 9(7), e101185. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101185>
82. Fu, Y.-S., Yeh, C.-C., Chu, P.-M., Chang, W.-H., Lin, M.-Y. A., & Lin, Y.-Y. (2022). Xenograft of Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells Promotes Recovery from Chronic Ischemic Stroke in Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6), 3149. <https://doi.org/10.3390/ijms23063149>
83. Liang, S., Zhou, J., Yu, X., Lu, S., & Liu, R. (2024). Neuronal conversion from glia to replenish the lost neurons. *Neural Regeneration Research*, 19(7), 1446–1453. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.386400>
84. Mendivil-Perez, M., Velez-Pardo, C., & Jimenez-Del-Rio, M. (2019). Direct transdifferentiation of human Wharton's jelly mesenchymal stromal cells into cholinergic-like neurons. *Journal of Neuroscience Methods*, 312, 126–138. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.11.019>
85. Hu, W., Qiu, B., Guan, W., Wang, Q., Wang, M., Li, W., Gao, L., Shen, L., Huang, Y., Xie, G., Zhao, H., Jin, Y., Tang, B., Yu, Y., Zhao, J., & Pei, G. (2015). Direct Conversion of Normal and Alzheimer's Disease Human Fibroblasts into Neuronal Cells by Small Molecules. *Cell Stem Cell*, 17(2), 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.006>
86. Wang, P., Zhang, H. L., Li, W., Sha, H., Xu, C., Yao, L., Tang, Q., Tang, H., Chen, L., & Zhu, J. (2014). Generation of Patient-Specific Induced Neuronal Cells Using a Direct Reprogramming Strategy. *Stem Cells and Development*, 23(1), 16–23. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0131>
87. Golas, M. M. (2018). Human cellular models of medium spiny neuron development and Huntington disease. *Life Sciences*, 209, 179–196. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.07.030>
88. Liu, Y., Xue, Y., Ridley, S., Zhang, D., Rezvani, K., Fu, X.-D., & Wang, H. (2014). Direct Reprogramming of Huntington's Disease Patient Fibroblasts into Neuron-Like Cells Leads to Abnormal Neurite Outgrowth, Increased Cell Death, and Aggregate Formation. *PLoS ONE*, 9(10), e109621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109621>
89. Lim, S. M., Choi, B.-O., Oh, S.-I., Choi, W. J., Oh, K.-W., Nahm, M., Xue, Y., Choi, J. H., Choi, J. Y., Kim, Y.-E., Chung, K. W., Fu, X.-D., Ki, C.-S., & Kim, S. H. (2016). Patient fibroblasts-derived induced neurons demonstrate autonomous neuronal defects in adult-onset Krabbe disease. *Oncotarget*, 7(46), 74496–74509. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12812>
90. Liu, M.-L., Zang, T., & Zhang, C.-L. (2016). Direct lineage reprogramming reveals disease-specific phenotypes of motor neurons from human ALS patients. *Cell Reports*, 14(1), 115–128. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.018>
91. Takayama, Y., Wakabayashi, T., Kushige, H., Saito, Y., Shibuya, Y., Shibata, S., Akamatsu, W., Okano, H., & Kida, Y. S. (2017). Brief exposure to small

- molecules allows induction of mouse embryonic fibroblasts into neural crest-like precursors. *FEBS Letters*, 591(4), 590–602. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12572>
92. Hoveizi, E., Mohammadi, T., Moazedi, A. A., Zamani, N., & Eskandary, A. (2018). Transplanted neural-like cells improve memory and Alzheimer-like pathology in a rat model. *Cytotherapy*, 20(7), 964–973. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.03.036>
93. Khazaei, N., Rastegar-Pouyani, S., O’Toole, N., Wee, P., Mohammadnia, A., & Yaqubi, M. (2018). Regulating the transcriptomes that mediate the conversion of fibroblasts to various nervous system neural cell types. *Journal of Cellular Physiology*, 233(4), 3603–3614. <https://doi.org/10.1002/jcp.26221>
94. Bueno, C., Martínez-Morga, M., García-Bernal, D., Moraleda, J. M., & Martínez, S. (2021). Differentiation of human adult-derived stem cells towards a neural lineage involves a dedifferentiation event prior to differentiation to neural phenotypes. *Scientific Reports*, 11, 12034. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91566-9>
95. Chu, X., & Wang, J. (2021). Dynamics and Pathways of Chromosome Structural Organizations during Cell Transdifferentiation. *JACS Au*, 2(1), 116–127. <https://doi.org/10.1021/jacsau.1c00416>
96. Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., Ge, J., Xu, J., Zhang, Q., Zhao, Y., & Deng, H. (2013). Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6146), 651–654. <https://doi.org/10.1126/science.1239278>
97. Zhao, Y., Zhao, T., Guan, J., Zhang, X., Fu, Y., Ye, J., Zhu, J., Meng, G., Ge, J., Yang, S., Cheng, L., Du, Y., Zhao, C., Wang, T., Su, L., Yang, W., & Deng, H. (2015). A XEN-like State Bridges Somatic Cells to Pluripotency during Chemical Reprogramming. *Cell*, 163(7), 1678–1691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.017>
98. Mitchell, A. J., Roediger, B., & Weninger, W. (2014). Monocyte homeostasis and the plasticity of inflammatory monocytes. *Cellular Immunology*, 291(1–2), 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.05.010>
99. Zhang, L., Yin, J.-C., Yeh, H., Ma, N.-X., Lee, G., Chen, X. A., Wang, Y., Lin, L., Chen, L., Jin, P., Wu, G.-Y., & Chen, G. (2015). Small Molecules Efficiently Reprogram Human Astroglial Cells into Functional Neurons. *Cell Stem Cell*, 17(6), 735–747. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.09.012>
100. Gascón, S., Masserdotti, G., Russo, G. L., & Götz, M. (2017). Direct Neuronal Reprogramming: Achievements, Hurdles, and New Roads to Success. *Cell Stem Cell*, 21(1), 18–34. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.06.011>
101. Masserdotti, G., Gascón, S., & Götz, M. (2016). Direct neuronal reprogramming: Learning from and for development. *Development (Cambridge, England)*, 143(14), 2494–2510. <https://doi.org/10.1242/dev.092163>



102. Pan, Z., Oh, J., Huang, L., Zeng, Z., Duan, P., Li, Z., Yun, Y., Kim, J., Ha, Y., & Cao, K. (2020). The combination of forskolin and VPA increases gene expression efficiency to the hypoxia/neuron-specific system. *Annals of Translational Medicine*, 8(15), 933. <https://doi.org/10.21037/atm-20-3871>
103. Rangasamy, S. B., Dasarathi, S., Nutakki, A., Mukherjee, S., Nellivalasa, R., & Pahan, K. (2021). Stimulation of Dopamine Production by Sodium Benzoate, a Metabolite of Cinnamon and a Food Additive. *Journal of Alzheimer's Disease Reports*, 5(1), 295–310. <https://doi.org/10.3233/ADR-210001>
104. Wang, X., Duan, C., Li, Y., Lu, H., Guo, K., Ge, X., Chen, T., Shang, Y., Liu, H., & Zhang, D. (2022). Sodium butyrate reduces overnutrition-induced microglial activation and hypothalamic inflammation. *International Immunopharmacology*, 111, 109083. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109083>
105. Kim, E. J., Leung, C. T., Reed, R. R., & Johnson, J. E. (2007). In Vivo Analysis of Ascl1 Defined Progenitors Reveals Distinct Developmental Dynamics during Adult Neurogenesis and Gliogenesis. *The Journal of Neuroscience*, 27(47), 12764–12774. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3178-07.2007>
106. Qin, H., Zhao, A., Ma, K., & Fu, X. (2018). Chemical conversion of human and mouse fibroblasts into motor neurons. *Science China. Life Sciences*, 61(10), 1151–1167. <https://doi.org/10.1007/s11427-018-9359-8>
107. Li, X., Fang, P., Yang, W. Y., Chan, K., Lavalley, M., Xu, K., Gao, T., Wang, H., & Yang, X. (2017). Mitochondrial ROS, uncoupled from ATP synthesis, determine endothelial activation for both physiological recruitment of patrolling cells and pathological recruitment of inflammatory cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 95(3), 247–252. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0515>
108. Tarsa, L., & Goda, Y. (2002). Synaptophysin regulates activity-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(2), 1012–1016. <https://doi.org/10.1073/pnas.022575999>
109. A, P.-D., J, S., Ar, de L., K, G., K, K., P, D., M, C., & W, K. (2017). Distinct retinoic acid receptor (RAR) isotypes control differentiation of embryonal carcinoma cells to dopaminergic or striatopallidal medium spiny neurons. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13826-x>
110. Mahony, S., Mazzoni, E. O., McCuine, S., Young, R. A., Wichterle, H., & Gifford, D. K. (2011). Ligand-dependent dynamics of retinoic acid receptor binding during early neurogenesis. *Genome Biology*, 12(1), R2. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-1-r2>
111. Koshy, A., Mathieux, E., Stüder, F., Bramoulle, A., Lieb, M., Colombo, B. M., Gronemeyer, H., & Mendoza-Parra, M. A. (2023). Synergistic activation of RAR $\beta$  and RAR $\gamma$  nuclear receptors restores cell specialization during stem cell differentiation by hijacking RAR $\alpha$ -controlled programs. *Life Science Alliance*, 6(2), e202201627. <https://doi.org/10.26508/lsa.202201627>

## 8. Streszczenie

Jedną z głównych przyczyn występowania niepełnosprawności są choroby neurodegeneracyjne, takie jak choroba Parkinsona, Alzheimera 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 transdyferencji, 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 transdyferencji 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 transdyferencji 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<sup>+</sup> MAP2<sup>+</sup> SYP<sup>+</sup>. 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<sup>+</sup> MAP2<sup>+</sup> SYP<sup>+</sup> 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.

## 9. Summary

One of the main cause of disability are neurodegenerative diseases, such as Parkinson, Alzheimer or Huntington. Despite continuously conducted research the therapeutic options for those conditions are still limited to the symptomatic treatments and the disease mechanism is still not well known. The cause for those limitations is based on the restricted regenerative capability of brain, which leads to shortage of neuronal cells for research purpose and cell based therapeutic strategies. The perfect solution for this issue seems to be the development of new source for neuronal cells. For this purpose, researchers create the procedure of neuronal transdifferentiation, which enable obtaining neurons from other somatic cells, such as fibroblast. Numerous of transdifferentiation methodologies has been designed till now, however their low efficiency, time consuming and invasive techniques of obtaining somatic cells still leave room for improvement and disqualification them for use in clinical studies. Moreover, the mechanism of this procedure is still not well known and needs better understanding.

The aim of this study was to compare the efficiency, cost and time for conducting the chemical transdifferentiation of monocytes into neurons and based on that develop a new, optimal procedure.

Monocytes used in his study were isolated from buffy coats using magnetic beads and phenotyped by flow cytometry. To conduct the procedure of neuronal transdifferentiation cells were seeded in 8-well slide chambers and incubated in induction medium I for 6 days or induction medium II for 7 days. Then the cell medium was exchange for maturation medium I, maturation medium II or maturation medium III depending on the tested methodology. Cells were incubated for 10 days, which was followed by a weeklong incubation of induced cells in medium with no small molecules. Cells were characterized using antibodies for MAP2, TUJ1, SYP, ASCL1 and CD14 in immunofluorescence staining. Moreover, the MAP2, TUBB3, ASCL1 and CD14 genes relative expression levels were estimated using RT-qPCR. The morphology of cells in culture was observed every day.

After 17 days of monocytes incubation in mediums developed for methodology no 3, the TUJ1<sup>+</sup> MAP2<sup>+</sup> SYP<sup>+</sup> neuronal cells were obtained. The relative expression levels for main neuronal genes MAP2, TUBB3 were also upregulated and reached the comparative levels to those observed for SH-SY5Y – positive control. The mediums were enriched with the following small molecules: chir99021, forskolin, Y-27632,

VPA, A83-01, TTNPB, NaB, cAMP and vitamin C. Similarly using the methodology no 4 TUJ1+ MAP2+ SYP+ neuronal cells were also obtained in 17 days, however induced neuronal cells did not exhibit as high levels of neuronal genes expression, as those obtained using methodology no 3. The mediums used in methodology no 4 contained following small molecules: chir99021, forskolin, Y-27632, VPA, A83-01, TTNPB, NaB, dorsomorphin. No neuronal cells were obtained using methodology no 1 and no 2. After a weeklong incubation of induced neuronal cells in medium with no small molecules, the expression of neuronal genes were significantly lower or undetected. Similarly, no fluorescence signal was detected for MAP or TUJ1.

The result indicates that the using of mediums enhanced with following small molecules: chir99021, forskolin, Y-27632, VPA, A83-01, TTNPB, NaB, cAMP and vitamin C is capable to transdifferentiate monocytes into neurons in 17 days. Moreover, it also enhance the essential role of RAR signaling in monocyte neuronal transdifferentiation.

## 10. Wykaz rycin

Ryc. 1. Transdyferencjacja i reprogramowanie, wg [8-11].....	9
Ryc. 2. Interakcje wybranych szlaków uczestniczących w procesie transdyferencjacji neuronalnej, opracowanie własne .....	17
Ryc. 3. Rozdzielenie kożuszka leukocytarno-płytkowego na poszczególne składniki...22	
Ryc. 4. Schemat transdyferencjacji neuronalnej z zastosowaniem metodyki 1 .....	24
Ryc. 5. Schemat transdyferencjacji neuronalnej z zastosowaniem metodyki 2 .....	25
Ryc. 6. Schemat transdyferencjacji neuronalnej z zastosowaniem metodyki 3 .....	26
Ryc. 7. Schemat transdyferencjacji neuronalnej z zastosowaniem metodyki 4 .....	27
Ryc. 8. Typy komórek określone na podstawie morfologii .....	28
Ryc. 9. Populacja komórek CD45+.....	31
Ryc. 10. Odsetek typów komórek występujących w hodowli – metodyka 1 .....	32
Ryc. 11. Zmiany morfologiczne monocytów transróżnicowanych z zastosowaniem metodyki 1 .....	32
Ryc. 12. Poziom ekspresji genów neuronalnych i CD14 na poszczególnych etapach transdyferencjacji monocytów metodyką 1 .....	34
Ryc. 13. Wyznaczenie przeciwciał neuronalnych i CD14 na poszczególnych etapach transdyferencjacji monocytów z zastosowaniem metodyki 1.....	35
Ryc. 14. Odsetek typów komórek występujących w hodowli – metodyka 2.....	36
Ryc. 15. Zmiany morfologiczne monocytów transróżnicowanych z zastosowaniem metodyki 2 .....	37
Ryc. 16. Poziom ekspresji genów neuronalnych i CD14 na poszczególnych etapach transdyferencjacji monocytów metodyką 2 .....	38
Ryc. 17. Wyznaczenie przeciwciał neuronalnych i CD14 na poszczególnych etapach transdyferencjacji monocytów z zastosowaniem metodyki 2.....	39
Ryc. 18. Odsetek typów komórek występujących w hodowli – metodyka 3.....	40
Ryc. 19. Zmiany morfologiczne monocytów transróżnicowanych z zastosowaniem metodyki 3 .....	41
Ryc. 20. Poziom ekspresji genów neuronalnych i CD14 na poszczególnych etapach transdyferencjacji monocytów metodyką 3 .....	42
Ryc. 21. Wyznaczenie przeciwciał neuronalnych i CD14 na poszczególnych etapach transdyferencjacji monocytów z zastosowaniem metodyki 3.....	43
Ryc. 22. Odsetek typów komórek występujących w hodowli – metodyka 4.....	44

Ryc. 23. Zmiany morfologiczne monocytów transróżnicowanych z zastosowaniem metodyki 4 .....	45
Ryc. 24. Poziom ekspresji genów neuronalnych i CD14 na poszczególnych etapach transdyferencjacji monocytów metodyką 4.....	46
Ryc. 25. Wyznaczenie przeciwciał neuronalnych i CD14 na poszczególnych etapach transdyferencjacji monocytów z zastosowaniem metodyki 4.....	47
Ryc. 26. Poziom ekspresji genów neuronalnych i CD14 dla komórek uzyskanych w wyniku przeprowadzenia etapu indukcji testowanych metodyk transdyferencjacji .....	49
Ryc. 27. Poziom ekspresji genów neuronalnych i CD14 dla komórek uzyskanych w wyniku przeprowadzenia połowy etapu dojrzewania testowanych metodyk transdyferencjacji .....	51
Ryc. 28. Poziom ekspresji genów neuronalnych i CD14 dla komórek uzyskanych w wyniku przeprowadzenia testowanych metodyk transdyferencjacji.....	53
Ryc. 29. Poziom ekspresji genów neuronalnych i CD14 dla komórek indukowanych, hodowanych w medium bez dodatku małych molekuł .....	54
Ryc. 30. Poziomy ekspresji genów neuronalnych i CD14 na wszystkich etapach przeprowadzonych metodyk transdyferencjacji.....	55

## **11. Wykaz tabel**

Tab. 1. Przegląd metod transdiferencjacji neuronalnej .....	13
Tab. 2. Skład mediów hodowlanych stosowanych w metodyce 1 .....	24
Tab. 3. Skład mediów hodowlanych stosowanych w metodyce 2 .....	25
Tab. 4. Skład mediów hodowlanych stosowanych w metodyce 3 .....	27
Tab. 5. Przeciwciała stosowane w barwieniu immunofluorescencyjnym .....	30

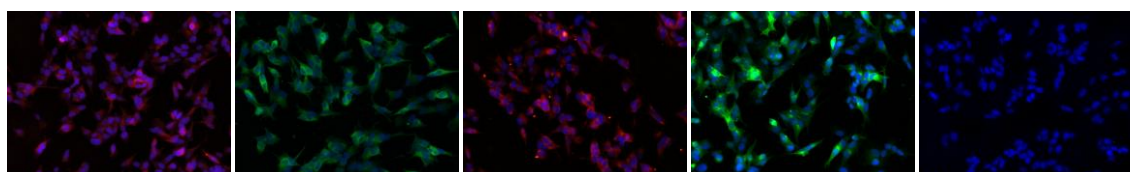


## 12. Supplement

**Tab. S1. Czystość wyizolowanej populacji komórek**

Lp.	Komórki / mL	Monocyty CD45+ CD14+	Monocyty CD14 ++ CD16 -	Monocyty CD14 ++ CD16 +	Monocyty CD14+ CD16 ++	Inne komórki CD45+
1	990 000	3,24 %	3,23 %	0 %	0,01 %	0,2 %
2	945 000	9 %	9 %	0 %	0 %	0,77 %
3	1 630 000	6,07 %	6,06 %	0 %	0,01 %	0,53 %
4	1 405 000	9,91 %	9,87 %	0 %	0,04 %	1,99 %
5	1 330 000	12,87 %	12,80 %	0 %	0,07 %	2,42 %
6	710 000	8,41 %	8,34 %	0 %	0,07 %	1,28 %
7	1 475 000	3 %	2,99 %	0 %	0,01 %	0,36 %
8	1 670 000	4,26 %	4,25 %	0 %	0,01 %	0,4 %
9	1 845 000	1,81 %	1,81 %	0 %	0 %	0,19 %
10	1 480 000	3,83 %	3,83 %	0 %	0 %	0,38 %
11	505 000	0,97 %	0,97 %	0 %	0 %	0,18 %
12	615 000	0,73 %	0,72 %	0 %	0,01 %	0,11 %
13	785 000	2,26 %	2,25 %	0 %	0,01 %	0,13 %

\*Podane dane stanowią odsetek całej populacji wyizolowanych komórek;



MAP2

TUJ1

ASCL1

SYP

CD14

**Ryc. S1. Wyznaczenie przeciwciał neuronalnych i CD14 na komórkach kontroli pozytywnej – SH-SY5Y**