

Uraz rdzenia kręgowego (SCI) będący przyczyną traumatycznych dysfunkcji czuciowo-ruchowych dotyka około 350 000 osób każdego roku. Uraz inicjuje kaskadę uszkodzeń wtórnych, z powodu których dochodzi do degradacji tkanki nerwowej. Ponieważ u ssaków nie obserwuje się regeneracji w uszkodzonym rdzeniu kręgowym, skutki urazu często prowadzą do trwałego kalectwa. Obecnie nie ma terapii naprawczych skutecznie odwracających destrukcyjne skutki urazu. W leczeniu klinicznym stosowane jest podejście rehabilitacyjne opierające się na zastosowaniu treningu lokomocyjnego, który wspomaga przebieg procesów plastyczności w układzie nerwowym, prowadząc do częściowego powrotu funkcji ruchowych. Natomiast w warunkach laboratoryjnych testowane są nowe metody, które dają bardziej obiecujące wyniki. Nowatorskie podejście terapii eksperymentalnych opiera się na wykorzystaniu komórek progenitorowych/macierzystych hodowanych *in vitro*. Testowane są przeszczepy zarodkowych komórek macierzystych ale budzą one wątpliwości natury etycznej a ich skuteczność jest ograniczona. Dlatego tak ważne jest, aby opracować alternatywne i bardziej skuteczne terapie urazów rdzenia kręgowego.

Jednym ze skutków urazu jest przerwanie włókien nerwowych biegnących wzdłuż rdzenia kręgowego. Aksony neuronów serotonergicznym (5-HT) pnia mózgu, które kontrolują funkcje lokomocyjne, ulegają zniszczeniu. Nasz zespół już wykazał, że przeszczepienie płodowego obszaru pnia mózgu zawierającego neurony 5-HT do rdzenia kręgowego poniżej całkowitego przecięcia, prowadzi do przywrócenia unerwienia 5-HT i przyczynia się do poprawy funkcji lokomocyjnych u szczurów paraplegicznych.

W planowanych przez nas badaniach pójdziemy o krok dalej. Naszym celem będzie wygenerowanie populacji wstępnie zróżnicowanych neuralnych komórek progenitorowych (NPCs), których transplantacja będzie bezpieczna i skuteczna. Przetestujemy hipotezę, zakładającą że modulacja warunków hodowli *in vitro* może skutkować ukierunkowanym różnicowaniem NPCs i generowaniem wybranych typów neuronów. Dzięki naszym badaniom będziemy w stanie ustalić, czy NPCs z różnych źródeł (egzogennych - płodowego pnia mózgu lub endogennych - ependymalnych z wyściółki kanału środkowego rdzenia kręgowego), wstępnie zróżnicowane pod kontrolą różnych czynników troficznych, będą w stanie różnicować się do specyficznych typów neuronów po transplantacji do rdzenia kręgowego i przyczynić się do poprawy utraconych funkcji lokomocyjnych.

Przestrzegając zasad 3R (zastąpienia, ograniczenia i udoskonalenia), większość naszych badań przeprowadzimy na komórkach w hodowli *in vitro*. Mając jednak świadomość, że złożoność składu komórkowego i molekularnego nie może być modelowana w hodowli komórkowej, planujemy również wykorzystanie organotypowych skrawków rdzenia kręgowego w warunkach *ex vivo*. Organotypowe skrawki rdzenia, jako model urazu rdzenia kręgowego, stanowią optymalne środowisko dla przesiewowego badania sposobów przywracania utraconego unerwienia monoaminergicznego przy użyciu przeszczepu wstępnie zróżnicowanych NPCs. W badaniach *in vitro* i *ex vivo* zidentyfikujemy najbardziej obiecujące populacje wstępnie zróżnicowanych NPCs, które następnie przetestujemy na dorosłych szczurach paraplegicznych w warunkach *in vivo*. Naszym celem jest udowodnienie, że modulacja rozwoju komórek poprzez ich wstępne ukierunkowane różnicowanie może skutkować wytworzeniem populacji NPCs odpowiednich do odbudowy brakującego układu neuroprzekazników w rdzeniu kręgowym poniżej całkowitego przecięcia.

W naszym projekcie planowane jest przeprowadzenie charakterystyki molekularnej (z wykorzystaniem techniki sekwencjonowania RNA) NPCs zróżnicowanych do fenotypu neuronalnego w warunkach *in vitro*. Zrozumienie charakterystyki transkryptomów komórek skierowanych na odmienne tory różnicowania jest ważne dla zainicjowania ich różnicowania w pożądanym kierunku. Wstępna analiza transkryptomów embrionalnych NPCs proliferujących w różnych warunkach *in vitro* oraz aktywowanych komórek ependymalnych po urazie rdzenia kręgowego pozwoliła zaproponować szlaki sygnałowe TGF β i Wnt - jako kandydatów do modulacji różnicowania ependymalnych NPCs w kierunku neuronów (ostatecznie w neurony 5-HT). Efekty modulacji obu ścieżek sygnałowych zostaną przetestowane w ramach proponowanego projektu. Zrozumienie mechanizmów molekularnych zaangażowanych w aktywację, proliferację i różnicowanie ependymalnych NPCs po urazie rdzenia kręgowego może przyczynić się do opracowania nowych terapii opartych na modulowaniu tych komórek bezpośrednio w kanale środkowym pacjenta.

Z klinicznego punktu widzenia komórki ependymalne mają znaczną przewagę nad innymi komórkami multipotencjalnymi (np. iPS), ponieważ mogą być łatwo i szybko dostępne (okno terapeutyczne w urazie rdzenia kręgowego jest wąskie), a ich różnicowanie może być modulowane zarówno przed, jak i po przeszczepie. Ponadto komórki te są aktywowane już w miejscu urazu, a ich udział w procesach regeneracyjnych pozwala pominąć aspekt zgodności tkankowej. W przyszłości uzyskane przez nas dane, dotyczące sekwencjonowania, mogą stać się wiarygodnym źródłem poszerzającym dotychczasową wiedzę dotyczącą generowania nowych strategii terapeutycznych wykorzystujących modyfikację mikrośrodowiska w celu zwiększenia endogennej zdolności neurogeneracyjnej uszkodzonego rdzenia kręgowego.

Uważamy, że wykorzystanie endogennych NPCs rdzenia kręgowego do ukierunkowanego różnicowania może w przyszłości umożliwiać ponowne unerwienie rdzenia kręgowego *in situ*, co będzie nową, nie stosowaną dotąd, procedurą i może stać się obiecującą metodą leczenia pacjentów z urazem rdzenia.