STRESZCZENIE

Wprowadzenie: Komórki macierzyste rąbka rogówki (LSC) odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy oraz regeneracji nabłonka rogówki. Ich uszkodzenie skutkuje zaburzeniem integralności powierzchni oka oraz pogorszeniem widzenia. Konserwanty stosowane w kroplach do oczu mogą działać cytotoksycznie, a jednym z najczęściej stosowanych jest chlorek benzalkoniowy (BAC). Długotrwałe narażenie na BAC może powodować dysfunkcję LSC. W ostatnich latach rośnie zainteresowanie wykorzystaniem sekretomu komórek macierzystych jako potencjalnej strategii terapeutycznej, ze względu na właściwości cytoprotekcyjne i regeneracyjne.

Hipoteza i cel główny pracy: Hipoteza badawcza zakłada, że BAC wykazuje działanie toksyczne wobec ludzkich LSC, prowadząc do zaburzenia ich żywotności oraz podstawowych funkcji biologicznych. Natomiast medium kondycjonowane (CM) pochodzące z komórek nabłonkowych (hAEC), mezenchymalnych (ADSC) oraz wykazującycyh fenotyp mieszany nabłonkowo-mezenchymalny (hAC) może ograniczać negatywne skutki działania BAC oraz wspierać regenerację komórek. Skuteczność tego działania może zależeć zarówno od fenotypu komórek źródłowych, jak i od momentu zastosowania CM względem ekspozycji na czynnik toksyczny.

Celem pracy była ocena wpływu ADSC-CM, hAEC-CM oraz hAC-CM na żywotność, migrację, proliferację, apoptozę oraz stan zapalny ludzkich LSC poddanych działaniu BAC w warunkach in vitro.

Materiał i metody: Badania przeprowadzono na ludzkich LSC hodowanych w warunkach in vitro i poddawanych działaniu BAC. W kolejnym etapie analizowano działanie ADSC-CM, hAEC-CM oraz hAC-CM, stosowanych jednocześnie z BAC (model 1) oraz po wcześniejszym uszkodzeniu komórek (model 2). Żywotność komórek oceniano testem MTT, a proliferację i migrację w testach CFA oraz scratch assay. Apoptozę analizowano metodą RT-qPCR (*BAX, BCL2, TP63, CASP3, CASP7*) oraz cytometrią przepływową. Ekspresję genów cyklu komórkowego (*E2F2, CCND1, CCND2, CDKN2A, CDKN2C, CCNE1, CCNE2, RB1*) oraz markerów zapalnych i szlaku NLRP3 (*IL-1β, IL-6, IL-4, IL-10, NLRP3, CASP1, IL-18, MMP3, MMP9, TIMP1*) oceniano metodą RT-qPCR, natomiast analizę cyklu komórkowego wykonano metodą cytometrii przepływowej.

Wyniki: Wykazano, że BAC wywiera istotny, zależny od dawki efekt cytotoksyczny na LSC. BAC w stężeniu 0,0002% powoduje znaczące obniżenie żywotności komórek, zahamowanie proliferacji oraz nasilenie apoptozy. Zastosowanie sekretomu komórek macierzystych częściowo odwracało niekorzystne efekty działania BAC. Najsilniejsze działanie ochronne zaobserwowano dla ADSC-CM, które istotnie poprawiało przeżywalność komórek, ograniczało apoptozę oraz wspierało regenerację. Efekt terapeutyczny wszystkich CM był bardziej wyraźny w modelu, w którym sekretom podawano jednocześnie z BAC, w porównaniu do modelu regeneracyjnego po uprzednim uszkodzeniu komórek.

Wnioski: BAC wykazuje silne, zależne od dawki działanie toksyczne wobec LSC. Sekretom komórek macierzystych, szczególnie pochodzący z ADSC, stanowi obiecujące podejście terapeutyczne w ochronie rąbka rogówki. Jednoczesne stosowanie sekretomu i BAC może być skuteczniejsze niż zastosowanie CM po wystąpieniu uszkodzenia.

Słowa kluczowe: komórki macierzyste rąbka rogówki; chlorek benzalkoniowy; sekretom komórek macierzystych; komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej; komórki nabłonka owodni; medium kondycjonowane