Gdański Uniwersytet Medyczny

Wydział Farmaceutyczny

Alina Mieczkowska

Transkryptomiczna ocena odpowiedzi na stymulację czynnikami proregeneracyjnymi komórek progenitorowych tkanki tłuszczowej

Praca doktorska

Promotor: prof. dr hab. Arkadiusz Piotrowski

Promotor pomocniczy: dr Natalia Filipowicz

Pracę wykonano w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Gdańsk 2022

Streszczenie

Poszukiwanie nowych związków o działaniu proregeneracyjnym, przyspieszającym regenerację tkanek i narządów jest ogromną nadzieją terapeutyczną, zwłaszcza w przypadku trudno gojących się, rozległych ran o różnej etiologii. Ocena efektu działania potencjalnych związków o właściwościach leczniczych powinna odbywać się na wielu płaszczyznach, aby zobrazować pełne spektrum ich możliwości. Wyniki niniejszej pracy są częścią wieloetapowego procesu obejmującego analizy *in vitro* oraz *in vivo* mające na celu poszukiwanie peptydów i peptydomimetyków stymulujących gojenie się ran. Procedura ta jest niezbędna nie tylko w celach badawczych, dzięki czemu możliwe jest zbadanie kaskady molekularnej wywołanej przez badane substancje, ale również zadbanie o pełne zweryfikowanie działania i bezpieczeństwa związków o potencjale terapeutycznym.

Model komórek macierzystych tkanki tłuszczowej jest jednym z bardziej optymalnych do transkryptomicznej oceny odpowiedzi na stymulację czynnikami proregeneracyjnymi. Jednak materiał kliniczny pozyskiwany jest zazwyczaj w niewielkich ilościach, a dalsze zastosowania ASCs, zarówno badawcze, jak i kliniczne, wymagają namnożenia komórek. Uzyskanie optymalnej ilości komórek wiąże się z koniecznością wydłużonego prowadzenia hodowli w warunkach *in vitro*. Obarczone jest to z kolei ryzykiem utraty fenotypu ASCs, ich właściwości i zdolności progenitorowych, dlatego niezbędne jest monitorowanie pozytywnych i negatywnych markerów ASCs podczas hodowli. Opracowany układ qPCR, wraz z metodami immunocytochemicznymi, pozwolił na wystandaryzowanie materiału do dalszych badań oraz na prowadzenie wydłużonej hodowli (do 6 pasaży).

W trakcie prac badawczych zaobserwowano dodatkowo ekspresję różnych izoform niektórych z badanych transkryptów w warunkach hodowli zawierających standardowy dodatek FBS (ang. *Fetal Bovine Serum*). Obserwacja ta może tłumaczyć rozbieżności literaturowe występujące chociażby w klasyfikacji części markerów ASCs. Charakterystyka komórek polega głównie na detekcji immunocytochemicznej, co może powodować zafałszowanie pomiarów, kiedy pominięta zostanie część epitopów przeciwciał w wyniku ekspresji różnych izoform. Odpowiednio scharakteryzowane komórki zostały poddane analizom porównawczym danych w warunkach standardowych i stymulowanych czynnikami proregeneracyjnymi. Wyniki z przeprowadzonych eksperymentów pozwoliły na wyselekcjonowanie grupy związków (peptydów i peptydomimetyków) wywołujących swoisty transkryptomicznie efekt stymulujący regenerację.

Summary

Finding new compounds with pro-regenerative effects, and accelerating tissue regeneration is great therapeutic hope. It is particularly important in cases dealing with difficult to heal, extensive wounds of various aetiologies. Potential compounds and their therapeutic properties should be evaluated on many levels to illustrate the full spectrum of their potential. The results of this study are a part of a multi-stage process including *in vitro* and *in vivo* analysis. The main aim is to search for peptides and peptidomimetics that stimulate wound healing. This procedure is necessary for multiple purposes. In research, it allows us to study the molecular cascade caused by prepared substances and fully verify the action and safety of new drugs.

The Adipose - Derived Stem Cells (ASCs) model is one of the most optimal for transcriptomic evaluation of the response to stimulation with pro-regenerative factors. However, clinical material is usually collected in small amounts. Further research and clinical use of ASCs require cell proliferation. Obtaining the optimal number of cells necessitates extended *in vitro* cultivation. This, in turn, is associated with the risk of losing the ASCs phenotype, their properties and progenitor abilities. Therefore it is necessary to monitor positive and negative markers of ASCs during culturing. The developed qPCR system combined with immunocytochemical methods provides standardized material for further studies and extends culture up to 6 passages.

Additionally, the expression of various isoforms of some of the tested transcripts was observed in culture conditions containing a standard FBS (Fetal Bovine Serum) additive. This finding may explain occurring of the literature discrepancies, for example, in the classification of some ASCs markers. Cells are characterized mainly by immunocytochemical detection, which may result in false measurements when some antibody epitopes are missed by the expression of different isoforms. Correctly characterized cells were subjected to comparative data analysis under standard conditions and stimulated by pro-regenerative factors. As a result, it was possible to determine a group of compounds (peptides and peptidomimetics) that induce a specific transcriptomically stimulating regeneration effect.