

**mgr Sylwia Noga**

Tytuł pracy: „Ocena biogodności oraz wpływu podłoża opartych o związki grafenu na właściwości funkcjonalne ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych - w kontekście ich zastosowań w naprawie uszkodzeń niedokrwiennych tkanek”

## **STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ**

Choroby układu sercowo-naczyniowego (z ang. *cardiovascular diseases*; CVD) stanowią wg. danych Światowej Organizacji Zdrowia główną przyczynę zgonów w krajach rozwiniętych i zaliczane są do chorób cywilizacyjnych XXI wieku. Największy odsetek zgonów związanych z CVD spowodowany jest przez zawał mięśnia sercowego oraz jego powikłania. Mimo znacznego postępu medycyny w ostatnich latach, nadal nie opracowano skutecznej metody leczenia uszkodzonej tkanki mięśnia sercowego. Stąd też ciągle potrzeba poszukiwania alternatywnych terapii wspomagających tradycyjną farmakoterapię oraz interwencyjne zabiegi chirurgiczne, które zapobiegałyby niekorzystnej przebudowie tkankowej i wpłynęłyby na poprawę jakości życia pacjentów cierpiących na niewydolność serca i układu krążenia.

Od kilku lat wiele nadziei wiąże się z wykorzystaniem komórek macierzystych (KM) w terapii regeneracyjnej uszkodzonych tkanek serca, w tym w połączeniu z biogodnymi rusztowaniami zwiększającymi skuteczność terapii komórkowych. Jednym z obiecujących typów KM są mezenchymalne komórki macierzyste/ stromalne (z ang. *mesenchymal stem/ stromal cells*; MSCs) pozyskiwane z różnych źródeł, w tym ze sznura pępowinowego, które stanowią populację, charakteryzującą się wysokim potencjałem do różnicowania, niską immunogennością oraz aktywnością wydzielniczą regulującą funkcję innych komórek.

Aby ukierunkować różnicowanie KM coraz częściej wykorzystuje się osiągnięcia inżynierii tkankowej, stosując do hodowli komórek biogodne podłoża oparte o różne biomateriały. Jednym z obiecujących materiałów, dających potencjalne możliwości zastosowań w biomedycynie ze względu na wyjątkowe właściwości fizyko-chemiczne oraz mechaniczne, jest grafen oraz jego pochodne. Jednakże zastosowania tych materiałów jako potencjalnych podłoży zwiększających potencjał pro-regeneracyjny ludzkich komórek MSCs nie były dotychczas dobrze zbadane.

W związku z powyższym, celem niniejszej pracy było zbadanie biogodności podłoży hodowlanych opartych o nowo opracowane biomateriały grafenowe względem ludzkich MSCs pochodzących ze sznura pępowinowego oraz ocena ich wpływu na potencjał funkcjonalny tych komórek, w tym ich potencjał kardiomiogeny oraz angiogeny w warunkach *in vitro* oraz *in vivo* w wybranych modelach uszkodzeń niedokrwiennych tkanek.

W celu oceny biogodności wybranych podłoży opartych o grafen, wykonano szereg badań oceniających cytotoksyczność badanych podłoży oraz ich wpływ na wybrane właściwości biologiczne ludzkich komórek MSCs, w tym na morfologię, proliferację i żywotność, a także zdolność komórek do adhezji i aktywnej migracji po podłożach. W tej części badań wykazano, że wybrane parametry podłoży grafenowych tj. wielkość płatków tlenku grafenu (GO), stopień redukcji zredukowanego tlenku grafenu (rGO), grubość warstwy grafenowej podłoża, a także zastosowany rozpuszczalnik w zawiesinie grafenowej, z której przygotowywano podłoża, mają wpływ na efekt cytotoksyczny danego podłoża oraz na funkcje biologiczne komórek MSCs na nim hodowanych.

W kolejnym etapie zbadano także wpływ wybranych podłoży opartych o grafen na ich potencjał do różnicowania w komórki tkanek serca oraz potencjał angiogeny *in vitro*. W tej części badań wykazano, że wybrane podłoża GO i rGO mogą wpływać na różnicowanie kardiomiogenne oraz angiogenne MSCs w warunkach *in vitro*. W szczególności zaobserwowano wzrost potencjału angiogenego komórek hodowanych na podłożu rGO, na co wskazuje wysoka ekspresja wybranych genów związanych z angiogenezą zarówno w MSCs hodowanych na tym podłożu w pożywce różnicującej, jak i standardowej pożywce namnażającej (kontrolnej). Sugeruje to, iż samo podłoże może być czynnikiem indukującym różnicowanie się komórek MSCs. Potwierdzają to również wyniki testów funkcjonalnych przeprowadzonych *in vitro*.

W ostatniej części badań, najbardziej biogodne podłoże o właściwościach promujących właściwości proregeneracyjne ludzkich MSCs, w tym w szczególności potencjał angiogeny, zostało wykorzystane w celu prekondycjonowania komórek MSCs przed ich zastosowaniem w naprawie tkankowej w mysim modelu niedokrwienego uszkodzenia kończyny *in vivo*. W tym celu wykorzystano myszy szczepu SCID, którym przeszczepiono ludzkie MSCs hodowane w pożywce kontrolnej bądź różnicującej na podłożu opartym o rGO bądź kontrolnym TCPS, grupa kontrolna otrzymała roztwór PBS, w którym zawieszano komórki. Uzyskane wyniki wskazują na pozytywny wpływ MSCs na regenerację uszkodzonej kończyny względem kontroli (zwierząt, którym podano kontrolnie nośnik). Potencjalne mechanizmy stojące za obserwowanymi wynikami badania *in vivo* mogą być związane z aktywacją ekspresji szeregu genów związanych z indukcją angiogenezy, co zbadano z zastosowaniem ilościowej analizy ekspresji genów w czasie rzeczywistym w tkankach zwierząt po podaniu preparatów komórkowych MSCs oraz kontrolnych.

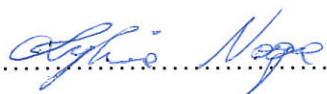
Otrzymane w niniejszej pracy wyniki wskazują na istotny wpływ właściwości fizykochemicznych podłoży opartych o związki grafenu na ich biogodność względem ludzkich komórek MSCs. Wykazano również, iż wyselekcjonowane podłoża oparte o rGO mogą promować potencjał proregeneracyjny oraz angiogeny w komórkach MSCs zarówno w testach *in vitro* jak i w mysim modelu niedokrwienia kończyny *in vivo*. Uzyskane dane stanowią istotny wkład w rozwój badań nad zastosowaniem biomateriałów opartych o grafen oraz komórek MSCs w potencjalnej terapii uszkodzeń tkanek wywołanych chorobami niedokrwienymi. Pozwolą one także w przyszłości opracować nowe protokoły różnicowania MSCs w wybrane typy komórek oraz będą stanowić podstawę dalszych badań w tym obszarze.

Akceptacja Promotora:



.....

Podpis Doktoranta:



.....