

**mgr Katarzyna Kornicka-Garbowska**

**Dziedzina:** Nauki biologiczne

**Dyscyplina:** Biologia

**Data otwarcia przewodu doktorskiego:** 08.05.2018

**Temat:** Modulacja metabolizmu i dynamiki mitochondriów oraz metylacji DNA komórek progenitorowych tkanki tłuszczowej izolowanych od koni z syndromem metabolicznym z wykorzystaniem resweratrolu i 5-azacytydyny.

**Promotor:** dr hab. Krzysztof Marycz, prof. nadzw.

**Recenzenci:** 1. dr hab. Ewa Zuba-Surma, prof. UJ

2. prof. dr hab. Ryszard Bobowiec

**STRESZCZENIE**

W ostatnich latach, zaburzenia endokrynologiczne stanowią narastający problem zarówno w medycynie ludzkiej jak i weterynaryjnej. Szacuje się, że wśród pogłowia koni otyłość sięga nawet 45% populacji i stale rośnie. Patologiczna otyłość, insulinooporność, a także ostre zapalenie tworzywa kopytowego (ochwat) to główne objawy syndromu metabolicznego koni (ang. *equine metabolic syndrome*, EMS). Rozwój tego schorzenia podyktowany jest m.in. stosowaniem nieprawidłowej, wysokowęglowodanowej diety oraz silnym stresem, które razem prowadzą do nadmiernej produkcji insuliny, kortyzolu i wolnych rodników. Obecnie terapia EMS opiera się na stosowaniu zbilansowanej diety i regularnym wysiłku fizycznym. Próby leczenia EMS środkami farmakologicznymi nie dały bowiem spodziewanych rezultatów. W związku z powyższym, poszukiwanie nowych strategii leczenia EMS jest absolutnie konieczne i uzasadnione.

Jedną z potencjalnych metod łagodzenia objawów EMS jest terapia komórkowa z zastosowaniem mezenchymalnych komórek macierzystych (ang. *mesenchymal stem cells*, MSC). Wykazują one zdolność do różnicowania się w wyspecjalizowane komórki i samoodnawiania (ang. *self-renewal*) swojej populacji. Co więcej, wytwarzają szereg cytokin i

czynników wzrostu a także wykazują działanie immunomodulujące przez co wspomagają regenerację tkanek. Dzięki tym unikatowym cechom, MSC próbuje wykorzystać się do leczenia chorób takich jak nowotwory, cukrzyca, zawał mięśnia sercowego, choroba Parkinsona. Wiele badań podkreśliło, że na właściwości cytofizjologiczne MSC wpływa wiele czynników, m.in. wiek, stan zdrowia dawcy, warunki pobierania tkanki i hodowli komórkowej. Podobne zjawisko ma miejsce w przypadku komórek izolowanych od koni ze zdiagnozowanym EMS, które charakteryzuje obniżone tempo proliferacji, upośledzona zdolność do różnicowania, zwiększona metylacja DNA a także obniżony metabolizm/dynamika mitochondriów, prowadzące w konsekwencji do nadmiernej akumulacji reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS). Jest to zjawisko szczególnie niekorzystne w kontekście aplikacji klinicznej tychże komórek.

Głównym celem pracy było zwiększenie użyteczności terapeutycznej komórek MSC izolowanych z tkanki tłuszczowej koni z EMS (ASC-EMS) poprzez przywrócenie macierzystości (ang. *stemness*) i odwrócenie procesu komórkowego starzenia (ang. *senescence*). Do „farmakoterapii” komórek wykorzystano dwa związki: 5-azacytydynę (AZA) i resweratrol (RES), które miały spowodować: usprawnienie metabolizmu mitochondriów, zatrzymanie procesów metylacji DNA, a przez to usprawnienie multipotencji, żywotności oraz immunomodulującego efektu „odmłodzonych” ASC-EMS.

W pierwszym etapie zbadano wpływ AZA/RES na stabilność fenotypu i utrzymanie właściwości multipotentnych przez ASC-EMS. Dalsze badania skupiły się na analizie tempa proliferacji, apoptozy, stresu oksydacyjnego, metabolizmu i dynamiki mitochondriów, autofagii i metylacji DNA. Wykazano, że hodowla ASC-EMS w obecności AZA/RES skutkuje znacznym wzrostem tempa proliferacji komórek, zmniejszeniem apoptozy i akumulacji ROS i usprawnieniu funkcjonalności mitochondriów. Za cytoprotekcyjny wpływ AZA/RES na ASC-EMS odpowiada m.in. aktywacja procesu mitochondrialnej fuzji. Co ważne, komórki ASC-EMS hodowane w obecności AZA/RES były zbliżone pod względem badanych parametrów do komórek izolowanych od koni zdrowych (ASC-CTRL), co potwierdziło cytoprotekcyjne właściwości tych związków. Dodatkowo, do odwrócenia negatywnych zmian zachodzących w komórkach ASC-EMS wystarczyła jedynie 24- godzinna hodowla w obecności wspomnianych związków.

W kolejnym etapie oceniono wpływ AZA/RES na różnicowanie się komórek ASC-EMS w chondrocyty i osteoblasty. Wykazano, że związki te usprawniają efektywność różnicowania się

poprzez modulację dynamiki mitochondriów i procesu autofagii. Zaobserwowano istotny wzrost ekspresji genów związanych z regulacją tych procesów oraz zmniejszenie metylacji DNA. Za obserwowane zjawiska w dużej mierze odpowiada wpływ AZA/RES na regulację procesów mitofagii i demetylacja DNA, która może skutkować zwiększeniem ekspresji genów związanych z procesem różnicowania, a przez to zwiększać jego wydajność.

Badania nad właściwościami immunomodulującymi komórek ASC-EMS hodowanych w obecności AZA/RES potwierdziły, że komórki te charakteryzuje większa zdolność do wyciszania stanu zapalnego. Co więcej, efektywniej aktywowały one limfocyty T regulatorowe (Treg)

Podsumowując, w przeprowadzonych badaniach objętych niniejszą rozprawą doktorską wykazano, że hodowla komórek ASC-EMS w obecności AZA/RES moduluje ich właściwości, odwracając proces komórkowego starzenia się. Komórki te charakteryzuje zwiększone tempo proliferacji, usprawnienie metabolizmu i funkcjonalności mitochondriów, większa plastyczność oraz efektywniejsza zdolność do aktywacji Treg. Na podstawie uzyskanych wyników można sądzić, że ASC-EMS hodowane w obecności AZA/RES stały by się lepszym i skuteczniejszym narzędziem terapeutycznym stosowanym w przebiegu EMS.

## **ABSTRACT**

In recent years, endocrine disorders have become a growing issue in both, human and veterinary medicine. It is estimated, that obesity affects 40% of global horse population and that parameter is growing steadily. Pathological obesity, insulin resistance and inflammation of the lamina of the hoof (laminitis) are common symptoms of equine metabolic syndrome (EMS). Disease develops as a result of an inappropriate diet rich in carbohydrates and chronic stress which together leads to excessive production of insulin, cortisol and free radicals. Nowadays, EMS therapy is based on the proper food management and regular exercise. Attempts have been made to treat EMS with pharmaceuticals although the results were not effective. Taking into consideration all the aforementioned arguments, development of novel strategies for the treatment of EMS is absolutely necessary and justified.

One of the alternative therapeutic approaches is based on the application of mesenchymal stem cells (MSC). Those cells exert ability to differentiate into multiple lineages and ability to self-renew. What is more, they secrete wide range of cytokines and growth factors as well acts as an immunomodulatory agent which contributes do enhanced regeneration of damaged tissue.

Due to their unique properties, an attempts have been made to apply MSC in the treatment of cancer, diabetes, myocardial infarction and Parkinson disease. Multiple research have indicated, that cytophysiological properties of MSC are affected by many factors including age, patient medical condition, method of tissue harvesting and cell culture. Similar phenomenon occurs in cells isolated from EMS affected individuals, which bare characterized by decreased proliferation rate and multipotency, increased DNA methylation and deterioration of mitochondrial metabolism/dynamics, which lead to excessive accumulation of reactive oxygen species (ROS). That fact can have tremendous consequences regarding clinical application of those cells.

The main purpose of this study was to increase therapeutic value of MSC isolated from adipose tissue of EMS diagnosed individuals (ASC-EMS) by restoring their stemness and reversing cellular senescence. For the pharmacotherapy of deteriorated cells, two substances: 5-azacytidine (AZA) and resveratrol (RES) have been applied in order to: improve mitochondria metabolism, diminish DNA methylation and in consequence to ameliorate multipotency, viability and immunomodulatory properties of “rejuvenated” cells.

In the first step, the effects of AZA/RES on phenotype stability and multipotency of ASC-EMS was investigated. Further studies focused on the analysis of: growth rate, apoptosis, oxidative stress, mitochondrial metabolism and dynamics, autophagy and DNA methylation. Obtained results revealed that, ASC-EMS treated with AZA/RES displayed increased proliferation rate, diminished apoptosis and ROS accumulation as well as amelioration of mitochondrial functionality. Cytoprotective effects of AZA/RES resulted from i.a activation of mitochondrial fusion. What is important, the parameter studied in ASC-EMS were comparable to those observed in cells isolated from healthy horses (ASC-CRTL), which confirmed cytoprotective characteristics of those compounds. Additionally, in order to reverse degenerative changes in ASC-EMS cells, only 24 hour culture with AZA/RES is required.

In the next step, the influence of AZA/RES on chondrogenic and osteogenic differentiation of ASC-EMS was established. Obtained results indicated, that those compounds enhance differentiation process by modulation of mitochondrial dynamics and autophagy. Increased expression of genes involved in differentiation process as well as decreased DNA methylation have been observed. Those phenomena resulted from the ability of AZA/RES to modulate mitophagy and DNA methylation which in consequence can activate expression of genes related to differentiation process and enhance its effectiveness.

Studies regarding immunoregulatory properties of ASC-EMS treated with AZA/RES revealed increased ability of those cells to reduce inflammation. What is more, those cells more effectively activated regulatory T cells.

To summarize, the conducted experiments revealed that, culture of ASC-EMS in the presence of AZA/RES modulates their properties by reversing their aged phenotype. Those cells are in consequence characterized by increased proliferation rate, enhanced mitochondrial dynamics and functionality, increased plasticity and more effective activation of regulatory T cells. Obtained research, indicates that, ASC-EMS treated with AZA/RES may become more effective therapeutic tool in the EMS treatment.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Tajana Kraljic". The signature is fluid and cursive, with a large initial 'T' and 'K'.