

Kompleksowa analiza profilu transkryptomycznego komórek macierzystych pochodzenia tłuszczowego podczas ich różnicowania do komórek kościo- i chrzęstnotwórczych w warunkach hodowli pierwotnej in vitro.

Maurycy Jankowski, MSci, Promotor: prof. Bartosz Kempisty

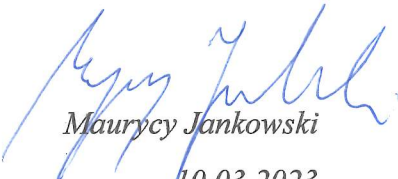
Komórki macierzyste pochodzenia tłuszczowego (ADSC) wykazują cechy mezenchymalnych komórek macierzystych, różnicując się w takie komórki jak osteoblasty, chondrocyty, komórki neuronalne czy miocyty. Większość prowadzonych badań dotyczących ADSC dotyczy możliwości ich zastosowania w celu zastąpienia szpiku kostnego jako łatwo dostępne i mniej inwazyjne źródło MSC. Rosnąca liczba potencjalnych zastosowań klinicznych opartych na ADSC podkreśla potrzebę badań analizujących ich właściwości, zarówno *in vivo*, jak i *in vitro*, a także ich ewentualne interakcje z innymi komórkami lub tkankami w organizmie.

Celem badań była analiza ekspresji genów podczas różnicowania komórek ADSC do osteoblastów i chondrocytów, w celu identyfikacji nowych markerów molekularnych tego procesu. Zakłada się, że uzyskane wyniki mogą dostarczyć nowych informacji na temat procesów molekularnych będących podstawą różnicowania ADSC do osteoblastów i chondrocytów, jak i stanowić punkt odniesienia do dalszych badań dotyczących potencjalnego zastosowania tych komórek. Do celów szczegółowych należały: optymalizacja procesu hodowli i różnicowania ADSC, kompleksowa analiza transkryptomiczna badanych komórek, analiza bioinformatyczna oraz literaturowa uzyskanych wyników w celu wyznaczenia nowych markerów molekularnych analizowanych procesów. Badania zostały oparte na modelu psa domowego (łac. *canis familiaris*) w związku z możliwością zastosowania uzyskanych wyników w opracowywaniu strategii terapeutycznych stanowiących podstawę medycyny regeneracyjnej.

W przeprowadzonych badaniach ADSC wyizolowane z próbek tłuszczu pochodzących z rutynowych zabiegów chirurgicznych zostały poddane długotrwałej hodowli *in vitro* i różnicowaniu do osteoblastów oraz chondrocytów. Identyfikacja ADSC w badanych próbach została przeprowadzona w oparciu o markery powierzchniowe (CD44+, CD90+, CD45-, CD34-), analizy morfologiczne oraz potwierdzenie ich zdolności do różnicowania w wyniku zastosowania odpowiedniego barwienia (osteoblasty-alizaryna, chondrocyty-błękit alcjański). Następnie, RNA wyizolowane ze wszystkich grup badanych (ADSC po 1 dniu hodowli, ADSC po 14 dniach hodowli 2D, ADSC po 30 dniach hodowli 3D, osteoblasty po 14 dniach różnicowania, chondrocyty po 30 dniach różnicowania) zostało poddane analizie sekwencjonowania nowej generacji (RNAseq). W oparciu o uzyskane dane przeprowadzona została analiza bioinformatyczna, która pozwoliła na zidentyfikowanie genów o najbardziej zmienionej ekspresji po procesie długotrwałej hodowli ADSC oraz ich różnicowaniu do osteoblastów i chondrocytów.

Uzyskane wyniki pozwalają na potwierdzenie ekspresji znanych markerów różnicowania osteogennego (*HSD11B1*, *ZBTB16* i *DKK2*), wskazanie na geny regulujące różnicowanie ADSC do innych typów komórek (*GALNT15*, *HIF3A* i *CCBE1*) oraz zidentyfikowanie nowych markerów związanych z wpływem warunków *in vitro* i indukowanego różnicowania na ADSC (*CCDC3*, *GLP1R* i *COL6A6*). Ponadto wyniki przedstawionych badań wskazują na kilka genów, które mogą znaleźć zastosowanie jako nowe pozytywne (*MMP12*, *MPEG1*, *CHI3L1* i *CD36*) i negatywne (*CLEC3B* i *RXFP*) markery procesu różnicowania chondrogenego ADSC *in vitro*. Niektóre z tych genów o nieznanym obecnie funkcji okazały się jednymi z najbardziej regulowanych podczas różnicowania ADSC w kierunku osteoblastów (*KIAA1755* i *TMEM132C*), oraz chondrocytów (*OTOS* i *FAM180B*), sugerując ich wcześniej nieopisane funkcje w tych procesach.

Wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły zidentyfikować nowe markery różnicowania ADSC w kierunku osteoblastów i chondrocytów oraz stanowią ważny punkt odniesienia do dalszych badań dotyczących ich zastosowania w medycynie regeneracyjnej. Ponadto uzyskane wyniki potwierdzają wartość badań nad molekularnymi mechanizmami regulującymi procesy zachodzące podczas długotrwałej hodowli i różnicowania ADSC w warunkach *in vitro*.


Maurycy Jankowski
10.03.2023