

## C.1. POPULARNONAUKOWE STRESZCZENIE PROJEKTU

Zaburzenia endokrynologiczne w tym **syndrom metaboliczny koni (Equine metabolic syndrome - EMS)** stają się narastającym problemem w medycynie weterynaryjnej oraz w hodowli koni zarówno w Polsce, jak i na całym świecie. Co ważniejsze, zaobserwowano, że syndrom metaboliczny może dotyczyć również koni aktywnych sportowo, które przekarmiane są paszami wysokoenergetycznymi oraz wysokoskrobiowymi, co w konsekwencji wywołuje ochwat, a następnie sprzyja **zaburzeniom pracy trzustki** i prowadzi do rozwoju cukrzycy typu **II i insulinooporności**. Zauważono też, że konie z EMS charakteryzuje podwyższona akumulacja czynników stresowych, zarówno systemowo jak i miejscowo w tkance tłuszczowej. Nie bez znaczenia jest to dla komórek progenitorowych rezydujących w tkance tłuszczowej (Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Stem Cells - ASC), które w tak niesprzyjających warunkach tracą swoje największe atuty, jakimi są chociażby ich multipotentny, immunomodulujący czy pro-regeneracyjny charakter. W efekcie komórki ASC izolowane od koni ze zdiagnozowanym EMS cechuje **obniżone tempo proliferacji, dysfunkcja mitochondriów prowadząca do nadmiernej akumulacji reaktywnych form tlenu przy jednoczesnym spadku aktywności enzymów antyoksydacyjnych, a także zwiększony stopień metylacji DNA**. Wiadomo bowiem, że nadmierna metylacja w obrębie genów prowadzi do wyciszenia ich ekspresji, co skutkuje wejściem komórki w proces starzenia, dlatego ramach realizacji projektu badawczego, przeprowadzona zostanie dogłębna analiza fenotypowa, molekularna oraz **sekwencjonowanie DNA z wzorcem metylacji** za modyfikację zasad azotowych, w szczególności cytozyny, grupą metylową odpowiadają enzymy z klasy metylotransferaz (DNMT). Jednym z inhibitorów DNMT jest 5-azacytydina, która przyczynia się do demetylacji nici DNA. Badania innych zespołów badawczych oraz nasze własne pokazują, że **5-Azacytydina nie tylko znacznie wzmacnia proliferację komórek ASC** i ekspresję genów pluripotencji, ale także **zwiększa efektywność różnicowania się ASC** w chondrocyty, osteocyty i neurony. Dodatkowo zaobserwowano zwiększoną aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) przy jednoczesnym **obniżeniu stężenia tlenu azotu i reaktywnych form tlenu (ROS)**. Ponadto, komórki suplementowane wspomnianym związkiem cechowało wzmożone wydzielanie mikropecherzyków błonowych (MVs). Udowodniono zostało, że również w komórkach ASC<sub>EMS</sub> kumulowane są w podwyższonej ilości czynniki stresowe tj. reaktywne formy tlenu (ROS), korzystnie terapeutycznie byłoby więc odwrócenie tego procesu. Do jednych z najsilniej działających przeciwutleniaczy należy resweratrol - związek organiczny zaliczany do polifenoli. Udowodniono, że jego podawanie daje wzorzec ekspresji genów zbliżony do występującego przy diecie niskokalorycznej, redukuje objawy starzenia w tym apoptozę i stany zapalne oraz obniża poziom cholesterolu we krwi. Wykazano też jego dobroczynny wpływ na metabolizm mitochondriów - znacząco zwiększa ich biogenezę oraz ekspresję SOD dzięki aktywacji czynnika transkrypcyjnego SIRT1. Co ciekawsze, najnowsze badania pokazują, że resweratrol zwiększa także wrażliwość komórek na insulinę. W związku z powyższym Autorzy zdecydowali się sprawdzić aktywność resweratrolu i 5-azacytydiny wobec komórek ASC, zakładając, że oba wymienione związki jako silne przeciwutleniacze i substancje o potencjale demetylacyjnym odpowiednio, w warunkach hodowli *in vitro* zatrzymają proces komórkowego starzenia się oraz zniwelują zmiany epigenetyczne. Połączenie obu wymienionych substancji na etapie hodowli *in vitro*, może w przyszłości być podstawą do **farmakoterapii komórek ASC<sub>EMS</sub>** na etapie poprzedzającym ich użycie w warunkach autologicznego leczenia syndromu metabolicznego. Autorzy zakładają, że pre-inkubacja ASC<sub>EMS</sub> *in vitro* z resweratrolem oraz 5-azacytydyną istotnie będzie hamować proces apoptozy, usprawniać metabolizm mitochondriów, odwracać zmiany epigenetyczne a w konsekwencji poprawiać właściwości sekrecyjne tychże komórek. Przewiduje się, że takie połączenie substancji czynnych o potencjale przeciwutleniającym i demetylacyjnym *in vitro* w odpowiednich stężeniach, będzie obniżać poziom akumulowanych w ASC<sub>EMS</sub> czynników stresowych tj. ROS, NO, a jednocześnie zwiększać syntezę czynników przeciwutleniających w tym SOD, katalazy oraz reduktazy tioredoksyny. Istotnie **wyższy charakter „przeciwutleniający”** komórek ASC<sub>EMS</sub> może znaleźć odzwierciedlenie w poprawie wielu funkcji życiowych badanych komórek takich jak żywotność, tempo proliferacji, multipotentjalny potencjał do różnicowania oraz zdolności sekrecyjne. Syntezowane i wydzielane przez komórki ASC mikrofragmenty błonowe MVs pełnią ważną funkcję immunomodulującą i wpływają na charakterystyczne dla syndromu metabolicznego odczyny zapalne. Uzyskanie frakcji MVs, które efektywnie będą aktywować limfocyty regulatorowe (T<sub>REG</sub>) może więc w przyszłości stanowić podwalinę leczenia EMS z zastosowaniem autologicznych komórek/lub MVs u koni. Dodatkowo Autorzy planują prześledzenie mechanizmu internalizacji i/lub oddziaływania MVs z upośledzonymi funkcjonalnie komórkami β trzustki wyizolowanymi od koni z EMS. Hipoteza badawcza zakłada, że MVs, zawierające zarówno cytokin przeciwzapalne, jak również czynniki wzrostu, będą skutecznie działać cytoprotekcyjnie na komórki β trzustki oraz usprawniać ich działanie poprzez poprawę funkcji mitochondriów. Farmakologiczne leczenie upośledzonych funkcjonalnie komórek macierzystych izolowanych od chorych koni, poprzez ich wstępną inkubację z substancjami przeciwutleniającymi i demetylacyjnymi może stać się pierwszym krokiem do poprawy ich potencjału terapeutycznego oraz opracowania w przyszłości skutecznej metody leczenia syndromu metabolicznego u koni.