

Streszczenie pracy doktorskiej

„Wpływ topografii (nano)materiałów na zachowanie ludzkich komórek neuralnych”

Niniejsza interdyscyplinarna praca doktorska została wykonana w Centrum NanoBioMedycznym Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Celem prowadzonych badań w ramach przygotowywanej rozprawy doktorskiej było badanie wzrostu i zdolności do różnicowania neuralnych komórek macierzystych oraz neuralnych linii komórkowych na wytworzonych podłożach (krzemowo-złoty, krzemowych i polimerowych) o ściśle określonej topografii powierzchni (nanorowki) oraz ustalonych właściwościach fizykochemicznych. Hipoteza badawcza zakładała, że badane matryce stanowią optymalne i biokompatybilne podłoża (ang. *Scaffolds*) do hodowli i ukierunkowanego wzrostu komórek neuronalnych oraz różnicowania neuralnych komórek macierzystych.

Od lat prowadzone są badania nad nanomateriałami, które mogą być wykorzystywane w inżynierii tkankowej. Intensywnie pracuje się nad wytworzeniem optymalnych podłoży komórkowych do regeneracji kości, tkanek i narządów takich jak skóra, pęcherz moczowy, tkanka chrzęstna oraz układ nerwowy. Takie podłoża powinny być przede wszystkim biokompatybilne, obojętne immunologicznie i nie zaburzać adhezji komórek, ich proliferacji i różnicowania. Wiele doniesień naukowych wskazuje na możliwość wpływu biomateriałów o określonych nanowzorach (nanopory, nanorowki, nanokolumny) na ukierunkowany wzrost, proliferację oraz różnicowanie komórek macierzystych.

W badaniach prowadzonych w ramach przygotowywanej rozprawy doktorskiej, wykorzystane zostały podłoża krzemowo-złote wytworzone metodą fotolitografii. Posłużyły one do wykonania pieczętek polimerowych o zróżnicowanej topografii powierzchni, techniką miękkiej litografii. W dalszej kolejności zostały zaprojektowane oraz wytworzone na podłożach krzemowych metodą fotolitografii ściśle określone wzory (nanorowki) matryc różniące się współczynnikiem proporcji (wysokością oraz szerokością wzorów). Otrzymane podłoża zostały scharakteryzowane za pomocą metod mikroskopowych: skaningowej mikroskopii elektronowej SEM (ang. *Scanning electron microscopy*) i mikroskopii sił atomowych AFM (ang. *Atomic force microscopy*). Na przygotowanych podłożach hodowano neuralne komórki macierzyste NSCs (ang. *Neural stem cells*), komórki

neuroblastomy SH-SY5Y oraz zarodkowe komórki nerki HEK-293. Komórki hodowane na uzyskanych matrycach obrazowano metodami mikroskopowymi (SEM, AFM, mikroskopia konfokalna) oraz analizowano ich proliferację i różnicowanie. Badane podłoża nie były toksyczne dla hodowanych komórek. Komórki neuralne wykazywały lepszy wzrost i różnicowanie na podłożach krzemowo-złoty o zróżnicowanej topografii powierzchni. Z tego względu do dalszych badań wybrano podłoża krzemowe o zmiennym współczynniku proporcji o wzorze powierzchni 10 μm , 5 μm i 1 μm . Następnie w celu sprawdzenia jak przebiega różnicowanie się komórek, przeprowadzono identyfikację białek markerowych charakterystycznych dla niezróżnicowanych oraz zróżnicowanych NSCs hodowanych na matrycach o zróżnicowanej topografii powierzchni. W komórkach zidentyfikowano białka markerowe NES, SOX2, OLIG2, DCX, GALC, MAP2 i SYP stosując metody immunocytochemiczne. Oszacowana została również długość i orientacja aksonów komórek hodowanych na badanych matrycach. Końcowym etapem badań była analiza globalna typu „shotgun” proteomów hodowanych komórek wykonana za pomocą chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS).

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że neuralne komórki macierzyste różnicują się na wszystkich typach matryc krzemowych. Jednak podłoża o wzorze 1 μm najefektywniej indukują różnicowanie neuronów, a matryce 10 μm i 5 μm wspierają ich wielokierunkowe różnicowanie. Świadczy o tym nie tylko obraz komórek uzyskany za pomocą mikroskopii optycznej i SEM, ale też detekcja markerów różnicowania (OLIG2, GALC, DCX, MAP2, SYP) oraz analiza proteomów komórek. Dodatkowo na podstawie analizy proteomów komórek hodowanych na matrycach, wyodrębniono markery różnicowania astrocytów (VIM), oligodendrocytów (LAMB2, MBP) i neuronów (TBR1, GAP-43, GMP6, KIF5C) oraz białka uczestniczące w synapsogenezie (PALM, NEFL, hnRNP K, YWHAZ).

W oparciu o wyniki przeprowadzonych badań można uznać, że badane rusztowania komórkowe mogą znaleźć zastosowanie w inżynierii tkankowej układu nerwowego do regeneracji uszkodzonych nerwów lub tkanek zniszczonych w przebiegu chorób neurodegeneracyjnych.

Badania prowadzone w zakresie pracy doktorskiej są realizowane w ramach grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki „Projektowanie i fabrykacja matryc o określonej topografii na bazie polimerów i nanostruktur węglowych do wzrostu i różnicowania neuralnych komórek macierzystych” (2016/23/N/ST5/00955).

Summary of doctoral thesis

“The influence of (nano)materials topography on the behavior of human neural cells”

Interdisciplinary doctoral dissertation was conducted in the NanoBioMedical Centre of Adam Mickiewicz University in Poznań.

The main aim of the research was to investigate the growth and ability of neural stem cells and neural cell lines to differentiate, while cultured on the carefully designed substrates (silicon-gold, silicon and polymeric) with precisely defined surface topography (nanogrooves) as well as recognized physico-chemical properties. The established research hypothesis is whether the fabricated patterned matrices are the optimal and biocompatible substrates (*scaffolds*) for culturing and direct growth of human neural cells and direct differentiation of neural stem cells (NSCs).

Various scientific groups have been looking for new materials which can be potentially applied in tissue engineering, for years. Currently, scaffolds are extensively studied in terms of their use in systems for bone regeneration as well as in regeneration of tissues or organs such as skin, bladder, cartilage and nervous system. It has been also confirmed that various morphologies of nanomaterials (nanopores, nanogrooves, nanopillars) in form of scaffolds can significantly affect the stem cell growth, proliferation and differentiation.

However, an ideal medical scaffold should have specific biological properties, including biocompatibility, immunological inertness, minimal effect on negative cell adhesion, proliferation and differentiation.

In this research silicon-gold (Si-Au) matrices produced by photolithography were investigated. Si-Au matrices were used for polymeric patterned stamps fabrication by means of soft lithography technique. In the next step, patterned matrices with increasing aspect ratio of groove's length and width were fabricated via photolithography method.

As prepared matrices were examined by means of scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM). Next, human neural stem cells (hNSCs), SH-SY5Y neuroblastoma cells and HEK-293 human embryonic kidney 293 cells were seeded on the top surface of as prepared matrices. The cells cultured on the developed

matrices were analyzed using microscopic techniques (SEM, AFM, CLSM) in order to assess their ability to proliferate and differentiate.

All investigated scaffolds were not toxic to cells. The neural cells exhibit the best growth and differentiation on patterned silicon-gold matrices. For that reason, substrates with specific aspect ratio of 10 μm , 5 μm and 1 μm were selected for further studies. Then, in order to study the cell differentiation, the identification of marker proteins characteristic for undifferentiated and differentiated NSCs cultured on patterned matrices was performed. Marker proteins NES, SOX2, OLIG2, DCX, GALC, MAP2 and SYP were identified in the investigated cells using immunocytochemical methods. The analysis of the length and axons orientation was performed. In the final stage, a global shotgun analysis of proteins including transcription factors in proteomes of cultured cells was performed by mass spectrometry coupled with liquid chromatography (LC-MS/MS).

The obtained results indicate that the neural stem cells differentiate on all types of silicon matrices. However, 1 μm substrates induce neuronal differentiation most effectively while 10 μm and 5 μm matrices support their multi-directional differentiation. This is confirmed not only by optical microscopy and SEM images, but also by the detection of markers characteristic for differentiation (OLIG2, GALC, DCX, MAP2, SYP). It was also confirmed by analyzing the cell proteomes. Additionally, examination of cell proteomes cultured on patterned matrices, allowed for identification of differentiation-stage specific markers of astrocytes (VIM), oligodendrocytes (LAMB2, MBP), neurons (TBR1, GAP-43, GMP6, KIF5C) and proteins participating in synaptogenesis (PALM, NEFL, hnRNP K, YWHAZ).

Based on the results presented in this doctoral dissertation, it is concluded that the studied scaffolds can be potentially used in tissue engineering, specifically of the nervous system to regenerate injured nerves or damaged tissues in the course of neurodegenerative diseases.

The scope of the doctoral thesis was realized within the framework of the project financed by the National Science Centre "*Design and fabrication of matrices based on polymers and carbon nanostructures with specified topography for neural stem cells growth and differentiation*". (2016/23/N/ST5/00955).