

Abstract

Mesoglycan is a mixture of glycosaminoglycans able to enhance some fundamental processes in wounds repair. Particularly, it promotes the re-epithelialization through the action on keratinocytes and fibroblasts and supports angiogenesis. The mechanism of action by which the mesoglycan acts in this system is not still clear.

For this reason, one of the aims of my PhD project has been to study the molecular mechanism by which this mixture of glycosaminoglycans promotes tissue regeneration. The obtained in vitro data suggested that mesoglycan induced keratinocyte migration and differentiation, two important process for the correct repair of skin injury, and that some of these effects are carried out through the activation of syndecan-4/PKC α (SDC4/PKC α) pathway.

Another protein involved in a wide range of physiopathological process, including cell motility and differentiation, is Annexin A1 (ANXA1). The in vitro data obtained suggested that mesoglycan is able to induce the formation of ANXA1/S100A11 complex at the inner surface of the plasma membrane and that this event is mediated by SDC4 pathway. Moreover, the results showed a role for ANXA1 in mesoglycan-induced keratinocyte activation.

It is known that SDC4 participates to the formation and secretion of microvesicles (EVs) which may contribute to wound healing. ANXA1 contained in microvesicles was able to promote keratinocytes motility and differentiation by acting on Formyl Peptide Receptors (FPRs) in autocrine manner. Thus, the extracellular form of ANXA1 may be considered as a link to intensify the effects of mesoglycan.

These data contribute to the identification of an interesting autocrine loop ANXA1/EVs/FPRs in human keratinocytes, induced by mesoglycan.

Furthermore, we found that EVs secreted from keratinocytes treated with mesoglycan promoted migration and invasion on fibroblasts and endothelial cells, acquiring a mesenchymal phenotype. In presence of this kind of EVs the angiogenesis appeared strongly enhanced, suggesting that EVs deriving from keratinocytes treated with the GAGs mixture, trigger a paracrine positive feedback able to further amplify the effects of mesoglycan.

The third year of the PhD program, I had the opportunity to work at the William Harvey Research

Institute in London, where we have used endothelial cells isolated from Wild Type (WT) and Syndecan-4 null mice (Sdc4^{-/-}) C57BL/6 mice. We demonstrate that mesoglycan promotes cell motility and in vitro angiogenesis acting on the co-receptor SDC4. Additionally, we characterized EVs released by HUVEC cells and assessed their effect on angiogenesis. Particularly, we focused on ANXA1 containing EVs, since they may contribute to tube formation via interactions with FPRs and their bond stimulates the release of vascular endothelial growth factor (VEGFA) that interacts with vascular endothelial receptor-2 (VEGFR2) and activates the pathway enhancing cell motility in autocrine manner. Thus, we have shown that mesoglycan exerts its pro-angiogenic effects in the healing process triggering the activation of the three interconnected molecular axis: mesoglycan-SDC4, EVs-ANXA1-FPRs and VEGFA-VEGFR2.

Furthermore, we observed the mesoglycan ability in cell recruitment both through in vivo observations on C57BL/6 mice and biopsies harvested from patients affected by pressure ulcers. Finally, in order to create a medical device that guarantees greater comfort for the patient, in collaboration with the Department of Industrial Engineering (DIIN) of University of Salerno (UNISA), we impregnated the mesoglycan on a polycaprolactone foam, obtaining a prolonged release of the drug, favouring patient compliance.

Thus, these results could encourage to consider this mixture of glycosaminoglycans as a useful pro-healing drug in skin wound care.

Abstract

Il mesoglicano è una miscela di glicosaminoglicani in grado di potenziare alcuni processi fondamentali in riparazione delle ferite. In particolare, favorisce la ripitelizzazione attraverso l'azione sui cheratinociti e fibroblasti e supporta l'angiogenesi. Il meccanismo d'azione con cui agisce il mesoglicano in questo sistema non è ancora chiaro.

Per questo motivo, uno degli obiettivi del mio progetto di dottorato è stato quello di studiare il meccanismo molecolare di

quale questa miscela di glicosaminoglicani favorisce la rigenerazione dei tessuti. I dati in vitro ottenuti ha suggerito che il mesoglicano induce la migrazione e la differenziazione dei cheratinociti, due processi importanti

per la corretta riparazione delle lesioni cutanee e che alcuni di questi effetti vengano eseguiti attraverso il attivazione della via syndecan-4 / PKC α (SDC4 / PKC α).

Un'altra proteina coinvolta in un'ampia gamma di processi fisiopatologici, inclusa la motilità cellulare e differenziazione, è l'annexina A1 (ANXA1). I dati in vitro ottenuti suggeriscono che il mesoglicano lo sia in grado di indurre la formazione del complesso ANXA1 / S100A11 sulla superficie interna del plasma membrana e che questo evento è mediato dalla via SDC4. Inoltre, i risultati hanno mostrato un ruolo per ANXA1 nell'attivazione dei cheratinociti indotta da mesoglicano.

È noto che SDC4 partecipa alla formazione e alla secrezione di microvescicole (EV) che possono contribuire alla guarigione delle ferite. ANXA1 contenuto nelle microvescicole è stato in grado di promuovere i cheratinociti

motilità e differenziazione agendo sui recettori del peptide formilico (FPR) in modo autocrino. Quindi,

la forma extracellulare di ANXA1 può essere considerata come un collegamento per intensificare gli effetti del mesoglicano.

Questi dati contribuiscono all'identificazione di un interessante loop autocrino ANXA1 / EV / FPR in cheratinociti umani, indotti dal mesoglicano.

Inoltre, abbiamo scoperto che EVs secreti dai cheratinociti trattati con mesoglicano promossi migrazione e invasione su fibroblasti e cellule endoteliali, acquisendo un fenotipo mesenchimale. Nel presenza di questo tipo di EV, l'angiogenesi è apparsa fortemente potenziata, suggerendo che gli EV derivanti dai cheratinociti trattati con la miscela di GAG, innescano un feedback positivo paracrino in grado per amplificare ulteriormente gli effetti del mesoglicano.

Il terzo anno del programma di dottorato, ho avuto l'opportunità di lavorare presso la William Harvey Research

Institute di Londra, dove abbiamo utilizzato cellule endoteliali isolate da Wild Type (WT) e

Topi null Syndecan-4 (Sdc4 - / -) C57BL / 6 topi. Dimostriamo che il mesoglicano promuove la cellula

motilità e angiogenesi in vitro che agiscono sul co-recettore SDC4. Inoltre, abbiamo caratterizzato

EV rilasciati dalle cellule HUVEC e valutato il loro effetto sull'angiogenesi. In particolare, ci siamo concentrati sugli EV contenenti ANXA1, poiché possono contribuire alla formazione del tubo tramite interazioni con FPR e

il loro legame stimola il rilascio del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGFA) con cui interagisce

recettore endoteliale vascolare-2 (VEGFR2) e attiva la via che migliora la motilità cellulare in

modo autocrino. Pertanto, abbiamo dimostrato che il mesoglicano esercita i suoi effetti pro-angiogenici nel

processo di guarigione che innesca l'attivazione dei tre assi molecolari interconnessi: mesoglicano-

SDC4, EVs-ANXA1-FPR e VEGFA-VEGFR2.

Inoltre, abbiamo osservato la capacità del mesoglicano nel reclutamento cellulare sia in vivo

osservazioni su topi C57BL / 6 e biopsie raccolte da pazienti affetti da ulcere da pressione.

Infine, al fine di creare un dispositivo medico che garantisca un maggiore comfort per il paziente, in

collaborazione con il Dipartimento di Ingegneria Industriale (DIIN) dell'Università degli Studi di Salerno

(UNISA), abbiamo impregnato il mesoglicano su una schiuma di policaprolattone, ottenendo un rilascio prolungato

del farmaco, favorendo la compliance del paziente.

Pertanto, questi risultati potrebbero incoraggiare a considerare utile questa miscela di glicosaminoglicani

farmaco pro-guarigione nella cura delle ferite della pelle.