



Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Anna Łabędź-Masłowska

**Ocena potencjału biologicznego mikropęcherzyków
z hodowli antygenowo zdefiniowanych
komórek macierzystych szpiku kostnego
dla celów regeneracji tkanek**

Praca doktorska

Promotor: dr hab. Ewa Zuba-Surma, prof. UJ

Pracę wykonano w Zakładzie Biologii Komórki na Wydziale Biochemii,
Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Kraków 2018

Pragnę serdecznie podziękować:

Pani dr hab. Ewie Zubie-Surmie, Prof. UJ

promotorowi mojej pracy, za stworzenie warunków rozwoju naukowego, poświęcony mi czas, życzliwość, wszechstronną pomoc oraz nieocenione wsparcie merytoryczne podczas całego okresu realizacji niniejszej pracy doktorskiej.

Panu Prof. Buddhadeb Dawn'owi

z Cardiovascular Research Institute, Division of Cardiovascular Diseases, Univeristy of Kansas Medical Center, Kansas City z USA – opiekunowi zagranicznemu podczas mojego pobytu na stażu w kierowanym przez niego Instytucie, za umożliwienie mi realizacji części badań do niniejszej pracy doktorskiej, wsparcie merytoryczne oraz cenne uwagi.

Panu Prof. Ramaroson'owi Andriantsitohaina

z INSERM U1063, Stress Oxydant et Pathologies Métaboliques, Institut de Biologie en Santé, Université d'Angers, Angers z Francji – opiekunowi zagranicznemu podczas mojego pobytu na stażu w kierowanym przez niego Instytucie, za umożliwienie mi realizacji części badań do niniejszej pracy doktorskiej, wsparcie merytoryczne oraz cenne uwagi.

Koleżankom i Kolegom

z Zakładu Biologii Komórki WBBiB UJ,
z Cardiovascular Research Institute, Univeristy of Kansas Medical Center,
z INSERM U1063, Institut de Biologie en Santé, Université d'Angers,
za okazaną pomoc, życzliwość oraz stworzenie miłej atmosfery pracy.

Anna Łabędź-Masłowska

Praca została zrealizowana w ramach projektu TEAM/2012-9/6 z Fundacji na Rzecz Nauki Polskiej pt.: „*Bioaktywne mikrofragmenty z komórek macierzystych, jako nowe narzędzie w regeneracji tkanek*” kierowanego przez dr. hab. Ewę Zubę-Surmę, prof. UJ, na Wydziale Biochemii Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Wykonane w pracy eksperymenty były również finansowane ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach grantu badawczego POIG 01-01-02-00-109/09 pt. „*Innowacyjne metody wykorzystania komórek macierzystych w medycynie*” współrealizowanego przez dr. hab. Ewę Zubę-Surmę, prof. UJ na Wydziale Biochemii Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Doktorantka uzyskała także środki finansowe w ramach stypendium doktorskiego na rok akademicki 2016/2017 z Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu Etiuda nr 2016/20/T/NZ3/00516 pt. „*Ocena potencjału biologicznego mikropęcherzyków z hodowli antygenowo zdefiniowanych komórek macierzystych szpiku kostnego dla celów regeneracji tkanek*”, dzięki któremu część badań objętych niniejszą pracą wykonała w czasie stażu w ośrodku zagranicznym (CVRI Kansas University Medical Center, USA).

NAJWAŻNIEJSZE OSIĄGNIĘCIA DOKTORANTKI

Publikacje doświadczalne:

1. **Labeledz-Maslowska A**, Lipert B, Berdecka D, Kedracka-Krok S, Jankowska U, Kamycka E, Sekula M, Madeja Z, Dawn B, Jura J, Zuba-Surma EK. Monocyte Chemoattractant Protein-Induced Protein 1 (MCPIP1) Enhances Angiogenic and Cardiomyogenic Potential of Murine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One*. 2015 Jul 27;10(7):e0133746.
2. **Labeledz-Maslowska A**, Kamycka E, Bobis-Wozowicz S, Madeja Z, Zuba-Surma EK. Identification of New Rat Bone Marrow-Derived Population of Very Small Stem Cell with Oct-4A and Nanog Expression by Flow Cytometric Platforms. *Stem Cells Int*. 2016;2016:5069857.
3. Bobis-Wozowicz S, Kmiotek K, Kania K, Karnas E, **Labeledz-Maslowska A**, Sekula M, Kedracka-Krok S, Kolcz J, Boruckiowski D, Madeja Z, Zuba-Surma EK. Diverse impact of xeno-free conditions on biological and regenerative properties of hUC-MSCs and their extracellular vesicles. *J Mol Med (Berl)*. 2017 Feb;95(2):205-220.
4. Niewiarowska-Sendo A, **Łabędź-Maslowska A**, Kozik A, Guevara-Lora I. Bradykinin B2 receptor and dopamine D2 receptor cooperatively contribute to the regulation of neutrophil adhesion to endothelial cells. *Acta Biochim Pol*. 2018;65(3):367-375.
5. Koczurkiewicz P, Kowolik E, Podolak I, Wnuk D, Piska K, **Łabędź-Maslowska A**, Wójcik-Pszczola K, Pękała E, Czyż J, Michalik M. Synergistic Cytotoxic and Anti-invasive Effects of Mitoxantrone and Triterpene Saponins from *Lysimachia ciliata* on Human Prostate Cancer Cells. *Planta Med*. 2016 Dec;82(18):1546-1552.
6. Luty M, Kwiecień E, Firlej M, **Łabędź-Maslowska A**, Paw M, Madeja Z, Czyż J. Curcumin augments the cytostatic and anti-invasive effects of mitoxantrone on carcinosarcoma cells in vitro. *Acta Biochim Pol*. 2016;63(3):397-401.
7. Guevara-Lora I, Stalinska K, Augustynek B, **Labeledz-Maslowska A**. Influence of kinin peptides on monocyte-endothelial cell adhesion. *J Cell Biochem*. 2014 Nov;115(11):1985-95.
8. Guevara-Lora I, **Labeledz A**, Skrzeczynska-Moncznik J, Kozik A. Bradykinin and des-Arg10-kallidin enhance the adhesion of polymorphonuclear leukocytes to extracellular matrix proteins and endothelial cells. *Cell Commun Adhes*. 2011 Aug;18(4):67-71.

Artykuły przeglądowe:

1. Dąbkowski K, **Łabędź-Maslowska A**, Zuba-Surma E, Starzyńska T. [Role of the bone marrow derived stem cells in pancreatic inflammatory disorders]. *Pol Merkur Lekarski*. 2017 Apr 21;42(250):137-141.
2. Zuba-Surma E, **Labeledz-Maslowska A**, Kamycka E, Madeja Z, Ratajczak MZ. Wieloparametryczna klasyczna i obrazowa cytometria przepływowa w identyfikacji komórek macierzystych. *Cytometria polska* 2012;1(1):127-141.

Projekty własne:

„Ocena potencjału biologicznego mikropęcherzyków z hodowli antygenowo zdefiniowanych komórek macierzystych szpiku kostnego dla celów regeneracji tkanek” (2016/2017) - Projekt Etiuda finansowany przez Narodowe Centrum Nauki.

Udział w innych projektach naukowych realizowanych w grupie, kierowanych przez opiekuna pracy:

1. "Bioaktywne mikrofragmenty z komórek macierzystych jako nowe narzędzie w regeneracji tkanek" (2012-2015) - Projekt TEAM finansowany przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej.
2. „Innowacyjne metody wykorzystania komórek macierzystych w medycynie” (2010-2015) – projekt POIG finansowany ze środków Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.
3. „Badania efektywności mikrofragmentów z komórek macierzystych modyfikowanych genetycznie jako nośników miRNA o działaniu proangiogennym i kardiomiogennym” (2014-2017) - Projekt SONATA BIS finansowany przez Narodowe Centrum Nauki.
4. "Optymalizacja złożonych biokompatybilnych rusztowań opartych o grafen oraz zdefiniowane populacje komórek macierzystych dla celów regeneracji tkanek” (2015-2019) - Projekt SYMFONIA finansowany przez Narodowe Centrum Nauki.
5. "Opracowanie zoptymalizowanych metod leczenia uszkodzeń tkankowych w oparciu o innowacyjne kompozyty oraz mezenchymalne komórki macierzyste i ich pochodne u pacjentów z chorobami cywilizacyjnymi" (2017-2020) - Projekt STRATEGMED III „Profilaktyka i leczenie chorób cywilizacyjnych” finansowany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.

Stáže naukowe:

1. The University of Kansas Medical Center, Cardiovascular Research Institute, Kansas City, USA; 01.07.2017 – 30.09.2017 r.
2. Jagiellońskie Centrum Innowacji Sp. z o.o., Laboratorium Hodowli Tkanek i Komórek, Kraków, Polska; 15.07.2016 – 15.01.2017 r.
3. Universite d'Angers, Institut de Biologie en Santé, INSERM U1063, Stress Oxydant et Pathologies Métaboliques, Angers, France; 07.07.2015 – 11.09.2015 r.

Prezentacje konferencyjne:

1. "Extracellular Vesicles derived from Mesenchymal Stem Cells as a new promising tool in regeneration of ischemic tissue injury". Konferencja: XLIII Szkoła Zimowa Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego; Zakopane, Polska; 16-20.02.2016 r.
2. "Intravenous injected mesenchymal stem cell- derived extracellular vesicles are localized in site of ischemic injury and improve blood flow recovery in vivo". Konferencja: Regenerative potential of bone marrow derived cells used fresh or propagated in clinical settings; Wrocław, Polska; 14-16.12.2015 r.
3. "In vivo Very Small Embryonic-like Stem Cells are activated by acute tissue injury and participate in regeneration of ischemic tissue". Konferencja: World Conference on Regenerative Medicine; Leipzig, Niemcy; 21-23.10.2015 r.
4. "Activation of Bone Marrow- Derived Very Small Embryonic-Like Stem Cells by Acute Tissue Injury in vivo". Konferencja: Biological and Clinical Aspects of the use of Somatic Stem Cells in Regenerative Medicine; Wrocław, Polska; 16-17.12.2013 r.

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW	8
STRESZCZENIE	11
ABSTRACT	13
1. WSTĘP.....	15
1.1. Choroby niedokrwienne i metody ich leczenia	15
1.2. Komórki macierzyste w regeneracji niedotlenionych tkanek	19
1.3. Mezenchymalne komórki macierzyste - miejsce w klasyfikacji i właściwości biologiczne	21
1.4. Mechanizmy działania komórek MSCs w procesach regeneracji niedotlenionych tkanek	24
1.5. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe.....	29
1.5.1. Klasyfikacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, mechanizmy powstania i ich skład molekularny	29
1.5.2. Mechanizmy działania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.....	32
1.5.3. Funkcja i znaczenie biologiczne pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.....	34
1.5.4. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane przez komórki macierzyste i próby ich wykorzystania w regeneracji tkanek	36
2. CELE PRACY	40
3. MATERIAŁY I METODY.....	41
3.1. Materiał badawczy	41
3.1.1. Zwierzęta.....	41
3.1.2. Hodowle komórkowe	41
3.1.2.1. Izolacja oraz hodowla komórek MSCs	41
3.1.2.2. Hodowla mysich komórek śródbłonna serca (MCEC).....	43
3.1.3. Izolaty pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek MSCs (MSC-EVs).....	43
3.2. Metody i protokoły analityczne	43
3.2.1. Analiza morfologii i profilu antygenowego komórek MSCs	43
3.2.2. Analiza żywotności komórek.....	45
3.2.3. Analiza cyklu komórkowego	46
3.2.4. Badanie potencjału różnicowania komórek MSCs in vitro.....	46
3.2.5. Izolacja EVs z komórek MSCs	48
3.2.5.1. Kolekcjonowanie pożywek kondycjonowych z hodowli komórek MSCs.....	48
3.2.5.2. Izolacja EVs z pożywek kondycjonowanych metodą sekwencyjnego wirowania	48
3.2.6. Pomiar stężenia białka metodą Bradforda.....	50
3.2.7. Ocena integralności ultrastruktury MSC-EVs.....	50
3.2.8. Analiza wielkości MSC-EVs	51
3.2.9. Analiza wybranych markerów białkowych w preparatach MSC-EVs.....	51
3.2.10. Globalna analiza proteomiczna MSC-EVs	53
3.2.11. Analiza składu mikroRNA w MSC-EVs	55
3.2.12. Analiza obecności transkryptów mRNA w MSC-EVs	58
3.2.13. Analiza profilu antygenów powierzchniowych MSC-EVs	60
3.2.14. Ocena internalizacji MSC-EVs przez komórki MCEC in vitro	61
3.2.15. Ocena wpływu MSC-EVs na potencjał angiogeny komórek MCEC in vitro ...	62
3.2.16. Analiza ekspresji markerów aktywowanego śródbłonna naczyńowego na powierzchni komórek MCEC in vitro	64
3.3. Modele i procedury badań in vivo.....	65

3.3.1. Badania in vivo z wykorzystaniem mysiego modelu ostrego zawału mięśnia sercowego.....	65
3.3.1.1. Badanie retencji MSC-EVs w narządach po uszkodzeniu AMI	66
3.3.1.2. Badanie potencjału regeneracyjnego MSC-EVs po uszkodzeniu AMI	68
3.3.1.3. Analiza funkcjonalna serca in vivo - Badania echokardiograficzne (ECHO)..	70
3.3.1.4. Analiza histologiczna tkanek serca post mortem - Barwienie histochemiczne	70
3.3.2. Badania in vivo z wykorzystaniem mysiego modelu niedokrwienego uszkodzenia kończyny	72
3.3.2.1. Badanie retencji MSC-EVs w narządach po niedokrwienym uszkodzeniu kończyny	73
3.3.2.2. Badanie potencjału regeneracyjnego MSC-EVs po niedokrwienym uszkodzeniu kończyny	74
3.3.2.3. Analiza funkcjonalna in vivo - Badanie przepływu krwi w kończynach metodą Dopplera	76
3.3.2.4. Analiza histologiczna tkanek kończyny post mortem - Badania immunohistochemiczne i biochemiczne	76
3.3.2.4.1. Pomiar produkcji tlenku azotu (NO) oraz anionu ponadtlenkowego (O ₂ ⁻) techniką Elektronowego Rezonansu Paramagnetycznego (EPR)	77
3.3.2.4.2. Badanie ekspresji białek związanych z angiogenezą w tkankach.....	78
3.3.2.4.3. Barwienie immunofluorecencyjne skrawków mrożeniowych.....	79
3.4. Analiza statystyczna wyników	80
4. WYNIKI.....	81
4.1. Charakterystyka fenotypowa i funkcjonalna mysich komórek MSCs	81
4.2. Pozyskiwanie pożywek kondycjonowanych z hodowli komórek MSCs w celu izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych	85
4.3. Ocena morfologii i wielkości pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z hodowli komórek MSCs	86
4.4. Charakterystyka MSC-EVs na podstawie obecności markerów EVs	88
4.5. Charakterystyka bioaktywnej zawartości molekularnej przenoszonej przez MSC-EVs	96
4.5.1. Globalna analiza proteomiczna MSC-EVs	96
4.5.2. Analiza transkryptów miRNA i mRNA w komórkach MSCs oraz preparatach MSC-EVs.....	108
4.6. Oddziaływanie MSC-EVs z komórkami śródbłónka naczyń serca i ich wpływ na wybrane funkcje komórek in vitro	113
4.7. Badanie retencji MSC-EVs podanych dożylnie w mysim modelu zawału mięśnia sercowego in vivo	119
4.8. Badanie retencji MSC-EVs podanych dożylnie w mysim modelu niedokrwienego uszkodzenia kończyny in vivo	124
4.9. Ocena potencjału regeneracyjnego MSC-EVs oraz komórek MSCs w mysim modelu zawału mięśnia sercowego in vivo.....	127
4.10. Ocena potencjału regeneracyjnego MSC-EVs w mysim modelu niedokrwienego uszkodzenia kończyny in vivo	132
4.11. Analiza biochemiczna tkanek mięśniowych pobranych od myszy w modelu niedokrwienego uszkodzenia kończyny in vivo.....	136
5. DYSKUSJA.....	139
6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE	158
7. BIBLIOGRAFIA.....	159
8. ZAŁĄCZNIKI	176

WYKAZ SKRÓTÓW

- ABC** (ang. *ammonium bicarbonate*) - wodorowęglan amonu
- ACN** (ang. *acetonitrile*) - acetonitryl
- ADM** (ang. *adrenomedullin*) - adrenomodulina
- AFM** (ang. *atomic force microscopy*) - mikroskopia sił atomowych
- Akt** (ang. *protein kinase B*) – kinaza białkowa B
- AMI** (ang. *acute myocardial infarction*) - ostry zawał mięśnia sercowego
- ANG-1** (ang. *angiopoietin 1*) - angiopoetyna 1
- AT-MSCs** (ang. *adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*) - komórki MSCs z tkanki tłuszczowej
- BF** (ang. *bright-field*) – jasne pole
- BM-MSCs** (ang. *Bone marrow-derived mesenchymal stem cells*) - komórki MSCs pochodzące ze szpiku kostnego
- BMP-2** (ang. *bone morphogenetic protein-2*) białko morfogenetyczne kości 2
- BRUB** (ang. *Britton and Robinson universal buffer*) - bufor uniwersalny Britton & Robinson
- BSA** (ang. *bovine serum albumin*) - albumina z surowicy bydłowej
- CFU-F** (ang. *Colony Forming Unit- Fibroblast*) – jednostka tworząca kolonię fibroblastów
- CLI** (ang. *critical limb ischemia*) - przebieg ostry choroby niedokrwiennej kończyny
- CMCs** (ang. *cardiomyocytes*) - kardiomiocyty
- CSCs** (ang. *cardiac stem cells*) - komórki macierzyste serca
- CPCs** (ang. *cardiac progenitor cells*) – komórki progenitorowe serca
- DTT** (ang. *dithiothreitol*) - ditiotreitol
- ECM** (ang. *extracellular matrix protein*) - białko macierzy pozakomórkowej
- ECs** (ang. *endothelial cells*) - komórki śródbłónka naczyń
- eNOS** (ang. *nitric-oxide synthase*) – syntaza tlenku azotu
- EPCs** (ang. *endothelial progenitor cells*) - komórki progenitorowe śródbłónka
- EPO** (ang. *erythropoietin*) - erytropoetyna
- EPR** (ang. *electron paramagnetic resonance*) - elektronowy rezonans paramagnetyczny
- ERK** (ang. *extracellular signal-regulated kinases*) – zewnątrzkomórkowe kinazy regulowane sygnałem
- ESCRT** (ang. *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) – endosomalny kompleks białkowy wymagany do transportu
- EVs** (ang. *Extracellular Vesicles*) - pęcherzyki zewnątrzkomórkowe; mikropęcherzyki komórkowe
- FACS** (ang. *Fluorescence-activated cell sorting*) – analiza komórek w oparciu o ich właściwości fluorescencyjne techniką cytometrii przepływowej
- FBS** (ang. *fetal bovine serum*) - bydlęca surowica płodowa
- FDR** (ang. *false discovery rate*) - współczynnik fałszywych odkryć
- FGF-2** (ang. *fibroblast growth factor-2*) - czynnik wzrostu fibroblastów-2
- FGF-7** (ang. *fibroblast growth factor-7*) - czynnik wzrostu fibroblastów-7
- GFP** (ang. *Green Fluorescent Protein*) – białko zielonej fluorescencji
- GO** (ang. *Gene Ontology*) - Ontologia Genów
- HGF** (ang. *hepatocyte growth factor*) - czynnik wzrostu hepatocytów
- HIF-1 α** (ang. *hypoxia-inducible factor 1 α*) - czynnik indukujący niedotlenienie-1 α
- HSCs** (ang. *hematopoietic stem cells*) - krwiotwórcze komórki macierzyste
- i.m.** (ang. *intramuscular*) – podanie domięśniowe
- i.v.** (ang. *intraventricular*) – podanie dożylnie

I/R (ang. *ischemia/ reperfusion injury*) – uszkodzenie wywołane ischemią i reperfuzją

IGF-1 (ang. *insulin-like growth factor-1*) - insulinopodobny czynnik wzrostu 1

IHD (ang. *Ischemic Heart Disease*) - choroba niedokrwienna serca

IL-10 (ang. *interleukin-10*) interleukina 10

IL-1 β (ang. *interleukin-1 β*) interleukina 1 β

IL-4 (ang. *interleukin-4*) interleukina 4

IL-6 (ang. *interleukin-6*) interleukina 6

iPS (ang. *induced pluripotent stem cells*) - indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste

ISCT (ang. *International Society for Cellular Therapy*) - Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej

ISEV (ang. *International Society for Extracellular Vesicles*) - Międzynarodowe Towarzystwo Naukowe zajmujące się badaniami pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

KM (ang. *stem cells*) - komórki macierzyste

LAD (ang. *left anterior descending artery*) - tętnica przednia zstępująca

LC-MS/MS (ang. *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) - chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas

LI (ang. *limb ischemia*) - uszkodzenie niedokrwienne kończyny

LK (ang. *left ventricle*) - lewa komora

lncRNA (ang. *long non-coding RNA*) - długie niekodujące RNA

LVEDD (ang. *LV end diastolic diameter*) - końcowo- rozkurczowy wymiar wewnętrzny (średnica) LK serca

LVEDV (ang. *LV end diastolic volume*) - końcowo- rozkurczowa objętość LK serca

LVEF (ang. *left ventricle (LV) ejection fraction*) - objętość wyrzutowa LK serca

LVESV (ang. *left ventricle (LV) end-systolic volume*) - objętość końcowo-skurczowa lewej komory (LK) serca

MACS (ang. *magnetic-activated cell sorting*) – sortowanie komórek w oparciu o właściwości magnetyczne komórek

MALS (ang. *middle angle light scatter*) - średni kąt rozproszenia światła (parametr stosowany w wysokorozdzielczej cytometrii przepływowej)

MAPK (ang. *mitogen- activated protein kinase*) - kinaza białkowa aktywowana mitogenem

MCEC (ang. *mouse cardiac endothelial cells*) - mysie komórki śródbłónka serca

MFI (ang. *mean fluorescence intensity*) - średnia intensywność fluorescencji

miRNA (ang. *microRNA*) - mikroRNA

MMP-1 (ang. *matrix metalloproteinase 1*) - metaloproteinaza macierzy 1

MMP-2 (ang. *matrix metalloproteinase 2*) - metaloproteinaza macierzy 2

MMP-9 (ang. *matrix metalloproteinase 9*) - metaloproteinaza macierzy 9

MS (ang. *mass spectrometry*) - spektrometria mas

MSC-EVs (ang. *Mesenchymal Stem/ Stromal Cells- derived Extracellular Vesicles*) – pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane przez mezenchymalne komórki macierzyste/ stromalne

MSCs (ang. *Mesenchymal Stem/ Stromal Cells*) - mezenchymalne komórki macierzyste/ stromalne

MVB (ang. *multi-vesicular body*) – ciało wielopęcherzykowe

MVs (ang. *microvesicles*) - mikropęcherzyki

NO (ang. *nitric oxide*) - tlenek azotu

O₂⁻ (ang. *superoxide anion*) - anion ponadtlenkowy

PDGF-BB (ang. *Platelet-Derived Growth Factor-BB*) - płytkopochodny czynnik wzrostu BB

PGE2 (ang. *prostaglandin E2*) - prostaglandyna E2

PGF (ang. *prostaglandin F*) - prostaglandyna F

PI (ang. *propidium iodide*) - jodek propidyny

PU (ang. *perfusion unit*) – jednostka perfuzji krwi

ROS (ang. *reactive oxygen species*) - reaktywne formy tlenu
SDF-1 (ang. *stromal cell-derived factor-1*) - czynnik komórek zrębu 1
SFRP2 (ang. *Secreted frizzled-related protein 2*) wydzielane białko spokrewnione z białkami frizzled 2
TB-4 (ang. *thymosin beta 4*) - tymozyna 4
TEM (ang. *transmission electron microscopy*) - transmisyjna mikroskopia elektronowa
TFA (ang. *trifluoroacetic acid*) - kwas trifluorooctowy
TGF- β (ang. *transforming growth factor- β*) - transformujący czynnik wzrostu β
TIMP-1 (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinase-1*) - tkankowy inhibitor metaloproteinazy- 1
TIMP-2 (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinase-2*) - tkankowy inhibitor metaloproteinazy- 2
TIMP-9 (ang. *tissue inhibitor of metalloproteinase-9*) - tkankowy inhibitor metaloproteinazy- 9
TNF- α (ang. *tumor necrosis factor- α*) - czynnik martwicy nowotworów- α
TSP-1 (ang. *trombospondin 1*) - trombospondyna 1
UC-MSCs (ang. *umbilical cord-derived mesenchymal stem cells*) - MSCs izolowanych z galarety Whartona sznura pępowinowego
VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) - czynnik wzrostu śródbłónka naczyń
VSMCs (ang. *vascular smooth muscle cells*) - komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych

STRESZCZENIE

Komórki macierzyste (KM) od lat stanowią przedmiot szeregu badań, których celem jest m.in. poznanie biologii i mechanizmów działania tych komórek w odbudowie tkankowej, co daje nadzieje na ich praktyczne zastosowania w regeneracji uszkodzonych tkanek i narządów. Dotychczasowe wyniki wskazują, że jednym z istotnych mechanizmów odpowiedzialnych za efekty regeneracyjne zależne od KM jest ich aktywność parakrynną, związana z wydzielaniem szeregu bioaktywnych związków mających bezpośredni efekt na komórki endogenne w miejscu uszkodzenia. Populacją komórek, której w szczególności przypisuje się działanie parakrynną w stymulacji procesów naprawy tkankowej są komórki macierzyste mezenchymalne (ang. *mesenchymal stem/ stromal cells*, MSCs), pozyskiwane z różnych źródeł, w tym m.in. ze szpiku kostnego.

Bioaktywne związki o działaniu parakrynnym mogą być wydzielane do środowiska bezpośrednio lub uwalniane w formie zamkniętej w tzw. pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (ang. *extracellular vesicles*, EVs) uwalnianych przez komórki, w tym KM, w warunkach fizjologicznych, jak i po aktywacji. EVs stanowią sferyczne obłonione pęcherzyki, które są nośnikami bioaktywnych cząsteczek pomiędzy komórkami, w tym m.in.: białek błonowych i cytoplazmatycznych, cząsteczek mRNA i mikroRNA oraz lipidów. Dzięki temu EVs odgrywają istotną rolę w komunikacji międzykomórkowej, zapewniając wymianę bioaktywnych związków pomiędzy różnymi komórkami wpływając wzajemnie na ich funkcje. Rosnąca liczba doniesień z badań światowych wskazuje, że również EVs wydzielane przez KM mogą modulować funkcje innych komórek, w tym endogennych komórek somatycznych, progenitorowych i macierzystych rezydujących w tkankach, zwiększając tym samym również procesy regeneracyjne zachodzące w tkankach.

Celem badań wykonanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie właściwości biologicznych EVs wydzielanych przez mysie szpikowe komórki MSCs (MSC-EVs), w tym m.in. ich morfologii, fenotypu i składu molekularnego oraz ich wpływu na funkcje wybranych komórek somatycznych *in vitro*, a także potencjału regeneracyjnego MSC-EVs w mysich modelach uszkodzenia tkankowego *in vivo*, w tym: i) ostrego niedotlenienia mięśnia sercowego oraz ii) niedokrwiennego uszkodzenia kończyny.

W pierwszym etapie wyizolowano oraz oceniono profil wieloantygenowy mysich szpikowych komórek MSCs, jako komórek rodzicielskich dla badanych EVs. Następnie z pożywek kondycjonowanych z hodowli komórek MSCs izolowano MSC-EVs - z zastosowaniem metody sekwencyjnego wirowania obejmującego ultrawirowanie. Wykazano, że MSC-EVs stanowią heterogenną populację pęcherzyków z przeważającą komponentą mikrofragmentów błonowych (ektosomów) o wielkości około 170 nm. Dalsze badania izolatów MSC-EVs wykazały m.in. obecność frakcji wykazujących ekspresję tetraspanin (CD9, CD63, CD81), co świadczy o zawartości frakcji egzosomalnej, a także potwierdziły wzbogacenie badanych EVs we frakcję ektosomów przenoszących na swojej powierzchni antygeny błonowe typowe dla komórek rodzicielskich, w tym antygenów CD29, CD44, CD90, Sca-1 oraz receptora dla VEGF. W

kolejnych etapach obejmujących m.in. poszerzoną analizę proteomiczną oraz transkryptomiczną, wykazano, że MSC-EVs przenoszą szereg białek regulujących m.in. morfogenezę tkanek i struktur anatomicznych, odpowiedź na uszkodzenie, gojenie się uszkodzeń oraz odpowiedzialnych za komunikację i adhezję międzykomórkową, jak również transkrypty mRNA dla genów o działaniu proangiogennym oraz prokardiomiogennym, a także cząsteczki mikroRNA zaangażowane m.in. w regulację procesów regeneracji tkanek. W dalszych badaniach *in vitro* wykazano także wpływ MSC-EVs na wybrane funkcje dojrzałych komórek śródbłónka naczyń serca, w tym na ich potencjał angiogeny. Wykazano także efekt cytoprotekcyjny MSC-EVs względem tych komórek, w warunkach imitujących mikrośrodowisko stanu zapalnego *in vitro*.

W kolejnym etapie oceniono potencjał regeneracyjny izolowanych MSC-EVs w dwóch mysich modelach niedokrwionego uszkodzenia tkankowego *in vivo*. W modelu ostrego niedotlenienia mięśnia sercowego obserwowano istotną poprawę parametrów hemodynamicznych pracy serca oraz zmniejszenie rozmiarów blizny pozawałowej u zwierząt, którym MSC-EVs przeszczepiano domięśniowo w strefie okołozawałowej miokardium - w porównaniu do zwierząt kontrolnych, po miesiącu od przeszczepu. Uzyskane wyniki potwierdziły pozytywny wpływ MSC-EVs na anatomię i funkcję uszkodzonego miokardium *in vivo*.

W mysim modelu niedokrwionego uszkodzenia kończyny *in vivo*, po 24 godzinach od dożylnego podania MSC-EVs, obserwowano ich akumulację w niedotlenionych tkankach, w porównaniu ze zdrową kończyną oraz innymi tkankami. Po dłuższym czasie obserwacji (po 21 dniach od przeszczepu) zaobserwowano zwiększenie perfuzji tkanek w uszkodzonej kończynie po dożylnym podaniu MSC-EVs - w porównaniu do myszy grupy kontrolnej, która korelowała m.in. z aktywacją szlaków proangiogennych oraz wyższą liczbą kapilar obecnych w tkankach. Wyniki uzyskane w tym modelu wskazują m.in. na proangiogeny efekt MSC-EVs w niedotlenionych tkankach *in vivo*.

Podsumowując, w przeprowadzonych badaniach objętych niniejszą rozprawą doktorską wykazano, że EVs wydzielane przez mysie szpikowe komórki MSCs mogą przenosić szereg bioaktywnych cząsteczek, w tym białka zaangażowane m.in. w procesy naprawy uszkodzonych tkanek i organów oraz komunikację międzykomórkową, jak również transkrypty mRNA genów zaangażowanych w procesy angiogenezy i kardiomiogenezy oraz mikroRNA regulujące te procesy. MSC-EVs przenoszą także na swej powierzchni szereg antygenów charakterystycznych dla komórek MSCs, w tym cząsteczki adhezyjne i receptory biorące udział m.in. w angiogenezie. W badaniach *in vitro*, wykazano proangiogeny i cytoprotekcyjny efekt MSC-EVs w mysich komórkach śródbłónka naczyń, co może być wynikiem działania bioaktywnych cząsteczek przenoszonych przez MSC-EVs. Natomiast w mysich modelach niedokrwionego uszkodzenia tkanek, wykazano poprawę anatomii oraz funkcji uszkodzonych organów, co potwierdza potencjał regeneracyjny MSC-EVs *in vivo*.

ABSTRACT

Stem cells (SCs) have been recently an important subject of many studies focusing on their biology and mechanisms of action in tissue regeneration, which may result in their practical application in regeneration of several damaged tissues and organs. Current evidence from *in vitro* and *in vivo* studies strongly indicate that major mechanisms of stem cell-mediated tissue repair include not only effective stem cell differentiation, but also secretion of several factors impacting on endogenous cells in a paracrine manner. The population, which particular is attributed to such paracrine effects in the stimulation of tissue repair processes, are mesenchymal stem/ stromal cells (MSCs) obtained from various sources including bone marrow.

Bioactive compounds exerting paracrine activity can be released either directly into the environment or enclosed in extracellular vesicles (EVs) - secreted by cells (including SCs) under physiological conditions as well as after activation. EVs represent membrane-enclosed spherical vesicles, which are carriers of bioactive molecules between cells such as *e.g.* membrane and cytoplasmic proteins, mRNAs, microRNAs and lipids. As a result, EVs play an important role in cell-to-cell communication ensuring an exchange of bioactive compounds between different cells and affecting their functions. Growing number of reports indicate that also EVs secreted by the SCs may modulate functions of other cells including endogenous somatic cells, progenitors and SCs residing in tissues, thereby increasing regenerative processes in the tissues.

The aim of the research carried out under this doctoral thesis was to investigate the biological properties of EVs secreted by murine bone marrow- derived MSCs (MSC-EVs) including their morphology, phenotype and molecular composition as well as their influence on functions of selected somatic cells *in vitro* as well as their regenerative potential in murine models of tissue damage *in vivo* including in: i) acute myocardial infarction and ii) limb ischemia models.

In the first step, bone marrow-derived MSCs were isolated and then their multi-antigen profile was examined. MSCs were cultured under conditions *in vitro* that ensure their normal growth and phenotype and they constitute the parental cells for the EV studies. Then, MSC-EVs were isolated from the MSC conditioned media using a sequential centrifugation method including ultracentrifugation. MSC-EVs have been shown to contain a heterogeneous population of vesicles with the predominant component of membrane microfragments (ectosomes) of approximately 170 nm. Further studies conducted on EVs isolates showed presence of fractions expressing tetraspanins (CD9, CD63, CD81), which proves the content of exosomal fraction and confirmed the enrichment of the EVs in the ectosomal fraction possessing on their surface antigens typical for parental cells including CD29, CD44, CD90, Sca-1 antigens and the VEGFR2 receptor.

In the next stages, molecular content of MSC-EVs was characterized and extended proteomic and transcriptomic analysis revealed that MSC-EVs carry a great number of regulatory proteins - including proteins involved in morphogenesis of tissues and anatomical structures, response to injury, wound healing and responsible for communication and intercellular adhesion, as well as mRNA transcripts for proangiogenic

and procardiomyogenic genes and microRNA molecules involved in regulation of tissue regeneration processes. Further *in vitro* studies have also demonstrated the effect of MSC-EVs on selected functions of mature vascular endothelial cells (ECs) including on their angiogenic potential. Then, the cytoprotective effect of MSC-EVs on ECs have also been demonstrated under inflammatory conditions *in vitro*.

In the next stage, the regenerative potential of isolated MSC-EVs was evaluated in two murine models of ischemic tissue damage *in vivo*. In the first model of acute myocardial infarction (AMI), MSC-EVs were transplanted intramuscularly in the border zone of the AMI. One month after administration, in the group of mice treated with MSC-EVs, a significant improvement in hemodynamic parameters of the heart and a reduction in the size of the post-infarction scar was observed when compared to animals in control groups. The obtained results confirmed the positive effect of MSC-EVs on the anatomy and function of damaged myocardium *in vivo*. The regenerative potential of MSC-EVs was then examined in a murine model of limb ischemia (LI) *in vivo*. At 24 hours after intravenous (*i.v.*) administration of MSC-EVs, retention of MSC-EVs was observed mainly in hypoxic tissues when compared to healthy limb and other tissues. At 21 days post injury, we observed statistically significant improvement of tissue perfusion in the injured limb when compared to control healthy limb after *i.v.* administration of MSC-EVs, compared to control groups, which correlated with the activation of proangiogenic pathways and a greater number of capillaries present in the muscle tissues. The results obtained in this model indicate the proangiogenic effect of MSC-EVs exerted in hypoxic tissues *in vivo*.

In conclusion, the conducted studies have shown that EVs secreted by murine MSCs carry a great number of bioactive molecules including proteins involved *e.g.* in the processes of repairing damaged tissues and organs and intercellular communication, as well as mRNA transcripts for genes involved in angiogenesis and cardiomyogenesis and microRNAs involved in these processes. MSC-EVs also possess on their surface antigens characteristic for MSCs including adhesion molecules and receptors involved in angiogenesis. In *in vitro* studies, both pro-angiogenic and cytoprotective effects of MSC-EVs have been demonstrated in murine ECs, which may be the result of the activity of bioactive molecules carried by MSC-EVs. In contrast, in murine models of ischemic tissue injury, improved anatomy and function of damaged organs has been demonstrated, which confirms the regenerative potential of MSC-EVs *in vivo*.

1. WSTĘP

1.1. Choroby niedokrwienne i metody ich leczenia

Zjawisko niedokrwienia tkanek charakteryzuje się niedostatecznym dopływem krwi do danych tkanek różnych narządów lub określonych części ciała (np. kończyn). Zmniejszona perfuzja krwi powoduje niedostateczny transport tlenu oraz substancji odżywczych do komórek rezydujących w tkankach, w konsekwencji czego może prowadzić do niedotlenienia, a ostatecznie do uszkodzenia tkanek i narządów.

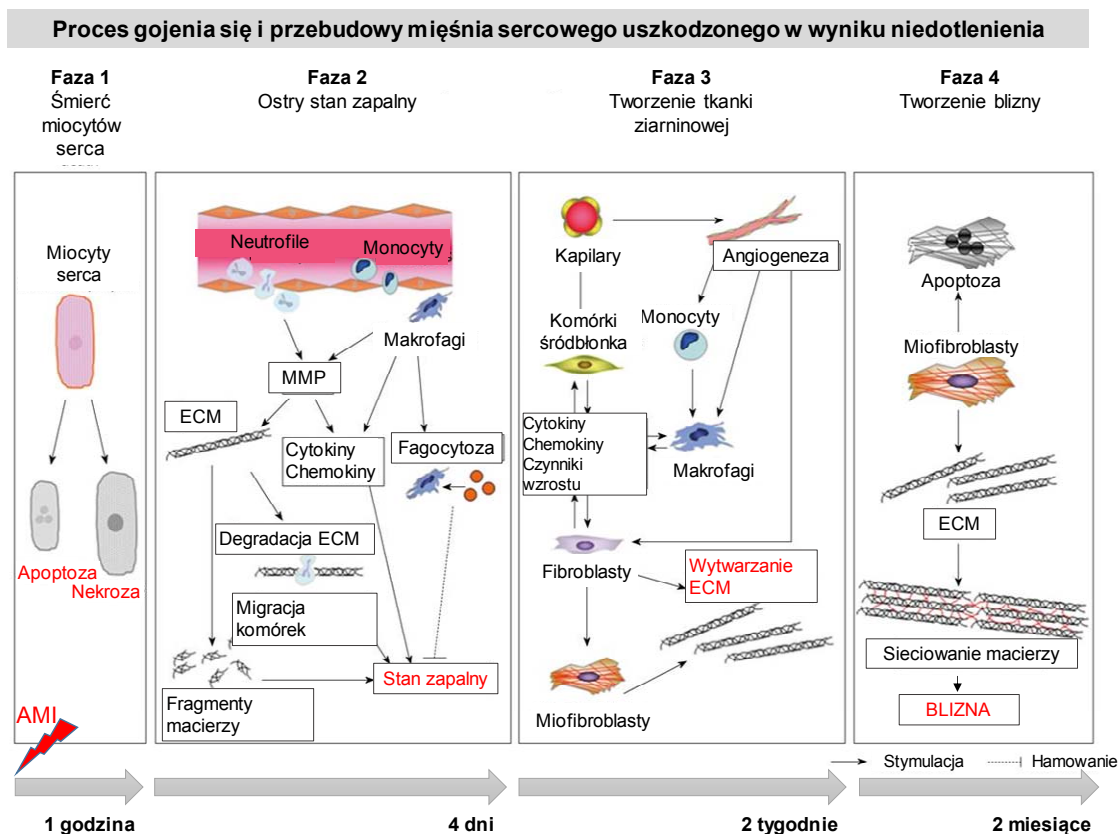
Główną przyczyną niedokrwienia tkankowego jest zwężenie lub zablokowanie światła tętnicy, najczęściej w następstwie tworzenia się blaszek miażdżycowych, skrzepin lub skurczu określonej tętnicy (1). Zaburzenie napływu krwi do określonych narządów lub części ciała może mieć charakter przewlekły - rozwija się przez kilka miesięcy lub lat, lub ostry, gdy pojawia się nagle (m.in. podczas wysiłku fizycznego) i zwykle ma bardziej gwałtowny przebieg, a jego konsekwencje mają niejednokrotnie gorsze rokowania. Niedokrwienie w następstwie zmian miażdżycowych najczęściej występuje w obrębie mięśnia sercowego, kończyn dolnych, a także mózgu (1–3).

Niedokrwienie może pociągać za sobą szereg zmian funkcjonalnych na poziomie pojedynczych komórek budujących tkanki, powodując ich dysfunkcję, a także często śmierć na skutek nekrozy bądź apoptozy (4–7).

W przebiegu niedotlenienia będącego wynikiem ostrego zawału mięśnia sercowego (ang. *acute myocardial infarction*, AMI) oraz następującego po nim gojenia się uszkodzonego organu, możemy wyróżnić następujące etapy: 1) śmierć kardiomiocytów następującą już w pierwszej godzinie od momentu zamknięcia światła tętnicy wieńcowej, 2) rozwój stanu zapalnego, który rozpoczyna migracja monocytów i neutrofilów do uszkodzonego obszaru mięśnia sercowego trwający do ok. 4 dnia od AMI, 3) tworzenie tkanki ziarninowej będącej efektem depozycji białek macierzy pozakomórkowej trwającej do 2 tygodni od momentu wystąpienia AMI, oraz 4) tworzenie blizny pozawałowej w wyniku depozycji m.in. kolagenu w obrębie tkanki objętej uszkodzeniem następujące do 2 miesięcy od momentu wystąpienia uszkodzenia (8,9). Wymienione etapy przedstawiono na Rycinie 1.

W pierwszych godzinach po AMI rozpoczyna się migracja neutrofilów i monocytów do miejsca uszkodzenia, natomiast wydzielane przez nie metaloproteinazy powodują degradację białek macierzy pozakomórkowej (ang. *extracellular matrix protein*, ECM) w obrębie uszkodzonej tkanki (10). Rozpoczyna się także proces fagocytozy martwych komórek oraz zdegradowanych białek ECM (8). W kolejnym etapie następuje tworzenie tkanki ziarninowej, któremu towarzyszy różnicowanie fibroblastów do miofibroblastów. Powstałe miofibroblasty wykazują aktywność wydzielniczą, proliferacyjną oraz kurczliwą w miejscu uszkodzenia (11). Makrofagi naciekające miejsce niedokrwienia wydzielają cytokiny i czynniki wzrostu, poprzez co stymulują fibroblasty serca do wytwarzania szeregu białek ECM, w tym kolagenu, proteoglikanów i glikoprotein, które stanowią główne komponenty tkanki ziarninowej, a następnie blizny pozawałowej (12,13). Główną funkcją tworzącej się blizny pozawałowej jest utrzymanie integralności tkanki

objętej uszkodzeniem i jej ochrona przed rozerwaniem (13). Podsumowując, następstwem utraty kardiomiocytów w rejonie tkanki serca objętej niedotlenieniem i stopniowym pogarszaniem funkcji tego organu, następuje patologiczna przebudowa anatomiczna mięśnia sercowego (1) widoczna w badaniach ultrasonograficznych jako zmniejszenie grubości ściany mięśnia sercowego w rejonie AMI (10).



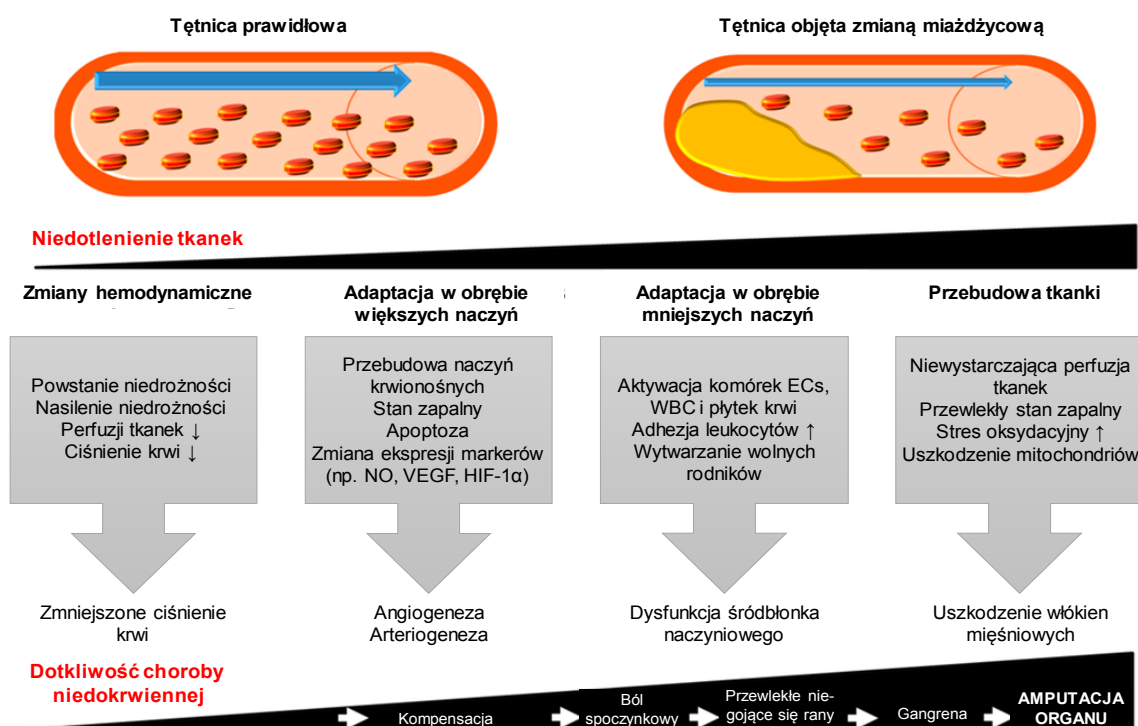
Rycina 1. Proces gojenia się i przebudowy tkanek mięśnia sercowego w następstwie niedotlenienia wywołanego zawałem. Proces gojenia się i przebudowy mięśnia sercowego po AMI można podzielić na cztery fazy: 1) śmierć kardiomiocytów na drodze apoptozy lub nekrozy; 2) rozwój ostrego stanu zapalnego; 3) tworzenie tkanki ziarninowej w rejonie wystąpienia niedotlenienia; oraz 4) tworzenie blizny pozawałowej. Na schemacie zaznaczono długość trwania poszczególnych faz. Źródło grafiki: (8), zmienione.

Choroba niedokrwienna serca (ang. *Ischemic Heart Disease*, IHD) spowodowana miażdżycą naczyń wieńcowych, a także jej powikłania w postaci ostrego zawału mięśnia sercowego oraz następującej po nim niewydolności serca, stanowią jedne z najczęstszych przyczyn zgonów w Polsce oraz na całym świecie (14,15). Współczesna metoda leczenia „świeżego” zawału serca polega na jak najszybszym podaniu leku rozpuszczającego skrzeplinę oraz wykonaniu interwencji kardiologicznej w postaci otwarcia światła zamkniętego naczynia tętniczego, co ma na celu ograniczenie uszkodzenia, a następnie martwicy tkanek serca (1). Pacjenci, u których wystąpiło niedotlenienie mięśnia sercowego na skutek zablokowania przepływu krwi w tętnicy wieńcowej, zgodnie z aktualnymi wytycznymi światowymi, w tym wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Kardiologicznego, mogą być poddani następującemu leczeniu inwazyjnemu: 1) wszczepieniu pomostów aortalno- wieńcowych, których rolą jest wytworzenie sztucznych

połączeń pomiędzy tętnicą główną a tętnicami wieńcowymi, które omijają miejsce zwężenia, poprawiając ukrwienie niedokrwionego obszaru mięśnia sercowego, 2) przezskórnej wewnątrznacyniowej angioplastyce wieńcowej, której celem jest poszerzenie światła zwężonej tętnicy z równoczesnym zastosowaniem stentów (16–18). W leczeniu choroby niedokrwiennej stosuje się także leczenie farmakologiczne, podczas którego pacjentom aplikuje się m.in. leki przeciwzakrzepowe, które zapobiegają zakrzepicy naczyń wieńcowych, czy też leki obniżające poziom cholesterolu we krwi (np. statyny) (17).

Wymienione inwazyjne oraz farmakologiczne metody ograniczania oraz leczenia skutków niedotlenienia mięśnia sercowego, kładą główny nacisk na poprawę jakości oraz przedłużenie życia pacjenta, natomiast nie są w stanie odwrócić skutków niedokrwienia tkanek serca, którym jest m.in. utrata funkcjonalnej tkanki mięśnia sercowego (19,20). Pomimo znaczącego rozwoju metod leczenia, metody te nie przynoszą oczekiwanych korzyści u wszystkich pacjentów, stąd pojawia się potrzeba ciągłego poszukiwania nowych metod leczenia zastępujących lub wspierających klasyczne metody terapeutyczne (21). Co ważniejsze, odsetek zgonów w Polsce na tle innych państw europejskich, jest ciągle stosunkowo wysoki (22). Duże nadzieje pokłada się dziś w metodach niefarmakologicznych, a wśród nich w terapiach opierających się na preparatach komórkowych, w tym na wykorzystaniu różnych typów komórek macierzystych i progenitorowych oraz ich pochodnych (tzw. leczenie regeneracyjne), jak również zdefiniowanych cząsteczek, np. zmodyfikowanych mikroRNA (tzw. terapia molekularna) (19,21,23).

Innym przykładem choroby niedokrwiennej jest postępujące niedokrwienie tkanek kończyny dolnej (ang. *Limb Ischemia*, LI) będące najczęściej wynikiem rozwijającej się miażdżycy naczyń obwodowych (24). Terminem tym określa się spadek perfuzji krwi w kończynie powodujący zagrożenie dla funkcji, a nawet żywotności całego organu (25). Głównymi przyczynami niedokrwienia może być zakrzepica, zatorowość, ale także uraz naczyń oraz tętniak obwodowy (26). Chorzy są często obciążeni innymi chorobami związanymi z postępującymi zmianami wewnątrznacyniowymi, takimi jak m.in. nadciśnienie tętnicze, choroba niedokrwienności serca, choroby naczyń mózgowych (27). Choroba ta może mieć charakter przewlekły lub ostry (28). Niedokrwienie kończyny dolnej występuje jednak zazwyczaj jako przewlekły, nasilający się z czasem proces, którego charakterystycznym objawem klinicznym jest chromanie przestankowe, czyli bóle mięśni pojawiające się podczas wysiłku fizycznego skutkujące ograniczeniem ruchowym pacjenta (27). Podczas stopniowego zwężania światła tętnicy, rozwija się krążenie oboczne, które łączy pień tętniczy poniżej i powyżej zablokowanego naczyń. Ilość krwi płynącej drogą krążenia obocznego jest zwykle wystarczająca do zapewnienia spoczynkowej przemiany materii w tkankach, natomiast niewystarczająca do zapewnienia przemiany materii podczas aktywności fizycznej (29). W przebiegu ostrym choroby niedokrwiennej kończyny (ang. *critical limb ischemia*, CLI), dochodzi do nagłego oraz szybko postępującego niedokrwienia kończyny, które może prowadzić do rozległej martwicy tkanek zagrażając choremu utratą tego organu (29). Na Rycinie 2 przedstawiono zmiany na poziomie komórek i tkanek na narastające niedotlenienie.



Rycina 2. Zmiany na poziomie tkanek i komórek w odpowiedzi na niedotlenienie w przebiegu choroby niedokrwiennej tętnic obwodowych. W wyniku powstałej zmiany miażdżycowej w świetle tętnicy obwodowej, następuje zmniejszenie ciśnienia krwi w tętnicy, skutkujące zmniejszoną perfuzją tkanek. Następnie pojawia się adaptacja do warunków hipoksji, której towarzyszy powstanie stanu zapalnego oraz powstawania krążenia obocznego. W wyniku pogłębiania się hipoksji, obserwuje się dysfunkcję śródbłonna naczyniowego. Kolejne pogłębianie się niedotlenienia, powoduje powstanie stresu oksydacyjnego oraz uszkodzenie mitochondriów w komórkach, co skutkuje uszkodzeniem włókien mięśniowych. W aspekcie kondycji pacjenta objętego chorobą niedokrwinną naczyń obwodowych, ból spoczynkowy przechodzi w pojawienie się trudno gojących się ran, z których rozwijać się może gangrena niosąca ryzyko amputacji organu. Źródło grafiki: (30), zmienione.

Pierwszym etapom niedotlenienia towarzyszy zmiana hemodynamiki przepływu krwi (spadek ciśnienia w naczyniach krwionośnych skutkujący niższą perfuzją tkanek) będący wynikiem ograniczenia drożności tętnicy. W tkankach rozpoczyna się proces zapalny oraz proces apoptozy komórek rezydujących w tkankach, w tym komórek mięśniowych. Wraz ze wzrostem nasilenia hipoksji, adaptacje w obrębie naczyń krwionośnych nie są już w stanie zrekompensować niedotlenienia, co powoduje dysfunkcję śródbłonna naczyń krwionośnych oraz rozprzestrzenianie się stanu zapalnego. Co więcej, nasila się proces powstawania wolnych rodników, któremu towarzyszy uszkodzenie mitochondriów w komórkach. W wyniku zmian na poziomie biochemicznym w obrębie organelli komórkowych i przedłużającego się stanu zapalnego, następuje uszkodzenie włókien mięśniowych, co przekłada się na powstawanie przewlekłych, nie gojących się ran, gangreny, a także ryzyko amputacji kończyny (30).

Ze względu na szybko posuwające się procesy degeneracji w niedotlenionej kończynie dolnej, w celu jej uratowania przed amputacją i zachowania jej funkcji, konieczne jest podjęcie prób rewaskularyzacji i przywrócenia przepływu krwi (26,29).

W przypadku CLI, stosuje się następujące leczenie inwazyjne: 1) endowaskularyzację - metodą angioplastyki balonowej niejednokrotnie połączoną z implantacją stentu naczyniowego, 2) wszczepienie pomostu naczyniowego - w celu ominięcia miejsca zwężenia oraz poprawy ukrwienia niedokrwionego obszaru mięśni kończyny, 3) miejscowe leczenie fibrynolityczne (29,31). Natomiast w leczeniu farmakologicznym wykorzystywane są m.in.: leki obniżające poziom cholesterolu, a także leki przeciwzakrzepowe czy też prostaglandyny wykazujące działanie rozkurczowe na system małych naczyń tętniczych (32). Dodatkowo, coraz większym zainteresowaniem cieszy się terapia energetyczna, której mechanizm działania polega m.in. na podwyższeniu potencjału energetycznego komórek poprzez wprowadzenie do tkanek określonej dawki energii (pochodzącej z prądu elektrycznego o określonych zakresach częstotliwości) pochodzącej m.in. z aparatu Hi-Top, co w efekcie stymuluje metabolizm komórek, a przez to pobudza naturalne mechanizmy naprawcze oraz normalizuje zaburzoną równowagę fizykochemiczną tkanek (33). Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że metody leczenia niedokrwienia kończyny dolnej oparte o pojedyncze protokoły nie dają pożądanych efektów terapeutycznych, a także nie mogą być zastosowane u wszystkich pacjentów, stąd wynika ciągła potrzeba łączenia dostępnych podejść leczniczych, a także poszukiwanie nowych strategii leczenia, np. przy użyciu substancji pochodzenia biologicznego (27).

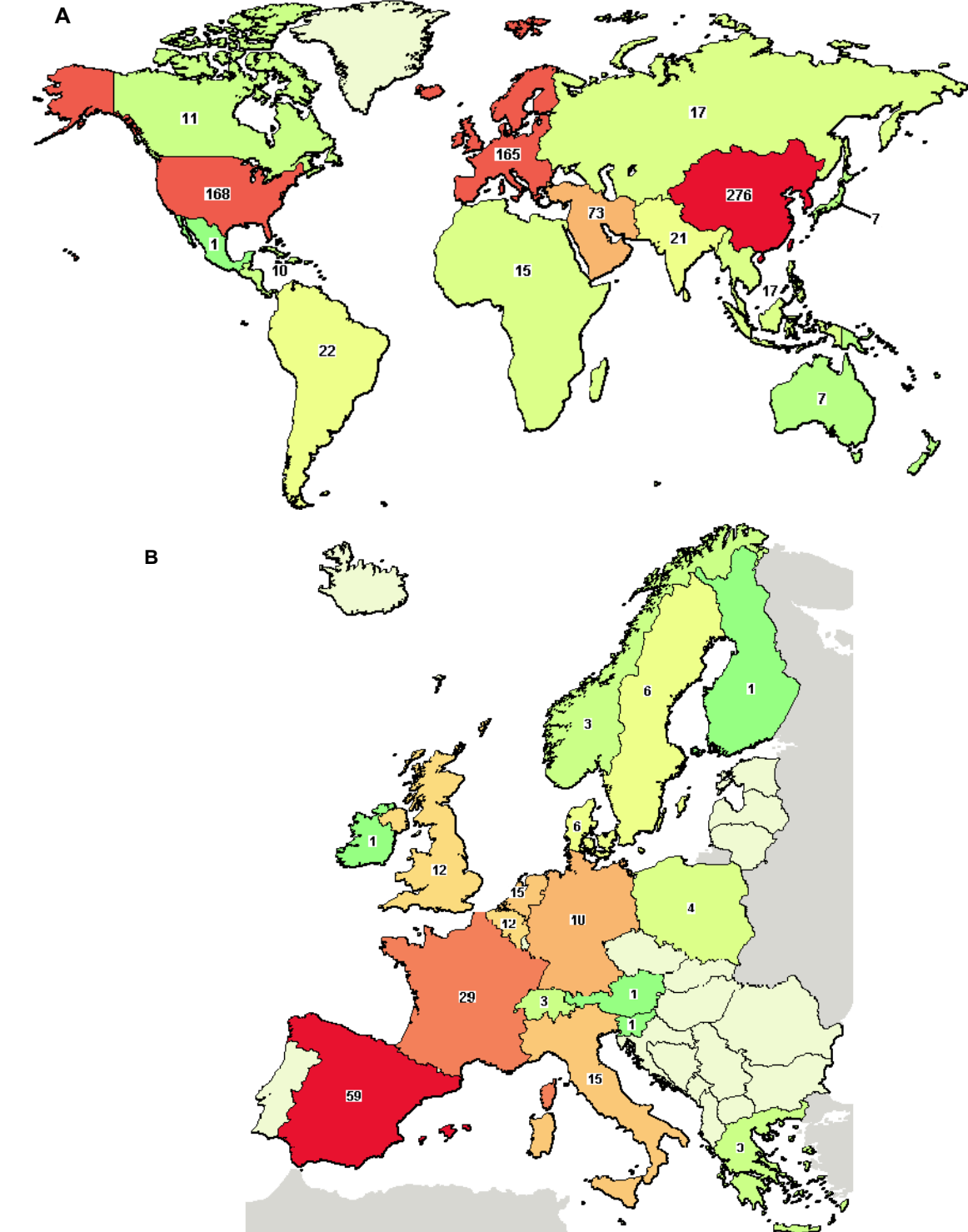
1.2. Komórki macierzyste w regeneracji niedotlenionych tkanek

W ciągu ostatniej dekady coraz większą uwagę poświęca się właściwościom regeneracyjnym komórek macierzystych (KM), w kontekście biologicznych strategii leczenia polegających na zastąpieniu komórek uszkodzonej tkanki nowymi komórkami pochodzącymi z KM, w tym mięśnia sercowego uszkodzonego w wyniku niedotlenienia (34,35). KM bierze się także pod uwagę, jako komórki mogące brać udział w neowaskularyzacji niedotlenionych tkanek, w tym tkanek serca, co może również odgrywać istotną rolę w poprawie funkcji tego organu (36–38).

Jednym z typów komórek, które od lat bada się w aspekcie ich potencjalnego przyszłego wykorzystania w medycynie regeneracyjnej w leczeniu uszkodzeń mięśnia sercowego lub poprawiających perfuzję w obszarze tkanki mięśniowej kończyn, są mezenchymalne/ stromalne KM (ang. *mesenchymal stem/ stromal cells*, MSCs) izolowane m.in. ze szpiku kostnego. Komórki te rezydujące zarówno u młodych, jak i dojrzałych dawców, od lat stanowią ważne i interesujące źródło KM przede wszystkim dla autotransplantacji i obecnie stanowią najszerzej wykorzystywaną populację KM w badaniach klinicznych na świecie ((36,39,40); *clinicaltrial.gov*).

W chwili obecnej w światowej bazie rejestrującej badania kliniczne - *ClinicalTrials.gov* - zarejestrowanych jest 878 prób klinicznych (w tym 243 zakończone), w których wykorzystuje się komórki MSCs. Biorąc pod uwagę kryteria wyszukiwania wg słów kluczowych: *Ischemic Heart Disease* oraz *Mesenchymal Stem Cells*, w bazie są zarejestrowane 44 próby kliniczne (w tym 15 zakończonych), w których wykorzystuje się komórki MSCs pochodzące z różnych źródeł w leczeniu choroby niedokrwiennej serca,

wykorzystuje się komórki MSCs.



Rycina 3. Próby kliniczne wykorzystujące komórki MSCs. A. Liczba prób klinicznych na świecie. **B.** Liczba prób klinicznych w Europie. Źródło grafiki: <https://clinicaltrials.gov>.

W Polsce są zarejestrowane 4 próby kliniczne, w tym dwie aktualnie rekrutujące pacjentów w leczeniu uszkodzeń po zawale mięśnia sercowego (ang. *Myocardial Infarction*) i stwardnieniu zanikowym bocznym (ang. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*) oraz dwie, które jeszcze nie rozpoczęły rekrutacji pacjentów z niewydolnością serca (ang. *Heart Failure*) oraz krytycznym niedokrwieniem kończyn (ang. *Critical Limb Ischemia*) (*ClinicalTrials.gov*).

1.3. Mezenchymalne komórki macierzyste - miejsce w klasyfikacji i właściwości biologiczne

Historię badań nad mezenchymalnymi komórkami macierzystymi określanymi także mezenchymalnymi komórkami zrębu (ang. *Mesenchymal stem/ stromal cells*) rozpoczął się w latach 70-tych XX wieku *Friendenstein i wsp.*, którzy zaobserwowali wydłużone, wrzecionowate komórki tworzące kolonie fibroblastyczne (ang. *Colony Forming Unit- Fibroblast*, CFU-F) w hodowli *in vitro* adherentnej frakcji komórek szpiku kostnego (41). Co więcej, ich wcześniejsze badania wykazały, że subpopulacje komórek szpiku kostnego wykazują zdolność do różnicowania w kierunku m.in. osteoblastów (42). Odkrycia te zapoczątkowały wzrost zainteresowania komórkami MSCs oraz poszukiwania tych komórek także w innych tkankach.

W hierarchii komórek macierzystych, uszeregowanej na podstawie ich zdolności do różnicowania w różne typy tkanek, na samym szczycie znajdują się komórki totipotencjalne, czyli dające początek zarówno wszystkim tkankom zarodka, jak również tkankom pozazarodkowym, czyli łożysku (43). Następną grupę w hierarchii stanowią komórki pluripotencjalne mogące różnicować w komórki wszystkich trzech listków zarodkowych, ale tracące zdolność wytwarzania tkanek łożyska (43,44). Najlepiej poznanym przykładem takich komórek są tzw. KM embrionalne izolowane najczęściej ze stadium blastocysty w rozwoju zarodkowym (45). Kolejną grupę stanowią komórki multipotencjalne, do których należą m.in. komórki MSCs, dające początek najczęściej komórkom różnych tkanek pochodzących z jednego listka zarodkowego (43). Ostatnią grupę komórek stanowią komórki unipotencjalne, czyli progenitorowe, rezydujące w różnych tkankach i różnicujące w jeden, konkretny typ komórek danej tkanki (44).

Komórki multipotencjalne, jakimi są komórki MSCs - wykazują wyższy stopień ukierunkowania tkankowego niż komórki pluripotencjalne, a zatem również bardziej ograniczone zdolności do różnicowania. Obecnie współcześni badacze podejmują dyskusję naukową oraz badania mające na celu ponowną weryfikację spełnienia następujących kryteriów „macierzystości” przez komórki MSCs:

- 1) zdolności do samoodnawiania na drodze symetrycznych podziałów komórkowych, w wyniku których powstają dwie identyczne komórki potomne o takim samym potencjale różnicowania (46);
- 2) zdolności do ukierunkowanego różnicowania, gdzie na drodze podziałów asymetrycznych lub w wyniku specyficznej stymulacji - tworzą bardziej dojrzałe komórki progenitorowe lub zróżnicowane komórki efektorowe (46,47);

- 3) zdolności do różnicowania w różne typy tkanowe, w tym adipocyty, chondrocyty, osteoblasty, a także kardiomiocyty i komórki śródbłónka (48–58).

Niezależnie od toczących się dyskusji naukowych, komórki MSCs ze względu na swoje właściwości biologiczne, które opisane zostaną w dalszej części tego rozdziału, stanowią przedmiot wielu badań przedklinicznych oraz klinicznych, jako komórki uczestniczące na drodze różnych mechanizmów działania – w naprawie uszkodzonych tkanek.

Jednym z głównych, a zarazem najbardziej poznanych źródeł komórek MSCs jest szpik kostny (59,60). Komórki o zbliżonej morfologii i cechach biologicznych można znaleźć także w innych tkankach pobranych od dorosłych dawców takich jak m.in. krew obwodowa (61), tkanka tłuszczowa (62), miazga zębowa (63), a także w tkankach płodowych, jak krew pępowinowa i galareta Whartona sznura pępowinowego (64).

Komórki MSCs pochodzące ze szpiku kostnego (ang. *bone marrow-derived mesenchymal stem cells*, BM-MSCs) wykazują podobieństwo morfologiczne i fenotypowe (w tym fenotyp wieloantygenowy: CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD166⁺, HLA-ABC⁺, CD11b⁻, CD14⁻, CD19a⁻, CD34⁻, CD45⁻, CD79⁻, HLA-DR⁻) do komórek MSCs z tkanki tłuszczowej (ang. *adipose tissue-derived mesenchymal stem cells*, AT-MSCs), jak również do komórek MSCs izolowanych z galarety Whartona sznura pępowinowego (ang. *umbilical cord-derived mesenchymal stem cells*, UC-MSCs) (48,65,66). Tkanki źródłowe, z których izoluje się komórki MSCs różnią się jednak zawartością tych KM. Dla przykładu, częstość występowania komórek MSCs w szpiku kostnym jest niższa niż częstość występowania tych komórek w tkance tłuszczowej (67,68). Szpik kostny zawiera od 0,0017 do 0,02% komórek MSCs spośród wszystkich komórek jednojądrzastych, podczas gdy w tkance tłuszczowej komórki te stanowią nawet od 5,0 do 25,6% wszystkich komórek tzw. frakcji stromalno- naczyniowej pozyskanej z tej tkanki (67,69). Liczba kolonii CFU-F powstałych po wysianiu takiej samej liczby komórek wyizolowanych ze szpiku kostnego lub tkanki tłuszczowej jest kilkakrotnie wyższa w przypadku tkanki tłuszczowej w odniesieniu do szpiku kostnego (48). Także komórki UC-MSCs cechują się wyższą częstością tworzenia kolonii CFU-F niż komórki BM-MSCs (70). Biorąc pod uwagę potencjał do różnicowania komórek BM-MSCs, AT-MSCs oraz UC-MSCs, komórki te wykazują porównywalną zdolność do różnicowania do osteoblastów, chondrocytów i adipocytów (48,49), co potwierdza ich pochodzenie mezodermalne.

Co więcej, komórki MSCs pochodzące z różnych w/w tkanek źródłowych, mogą być także różnicowane *in vitro* do komórek zbliżonych fenotypowo do kardiomiocytów, komórek śródbłónka naczyniowego oraz komórek nerwowych, jednak wydajność takiego różnicowania jest zmienna i uzależniona od ich pochodzenia tkankowego (51–57,71–78). Ponadto, w obrębie jednej hodowli komórek MSCs mogą występować komórki bardziej lub mniej predystynowane do różnicowania do określonego fenotypu komórki dojrzałej (47). Pomimo podobieństwa morfologicznego oraz antygenowego pomiędzy komórkami MSCs pochodzącymi z różnych tkanek źródłowych, wyniki badań światowych pokazują,

że komórki BM-MSCs mogą wykazywać inny profil ekspresji wielu genów w porównaniu do komórek MSCs pochodzących z łożyska (47), co sugeruje, że również komórki MSCs pochodzące ze szpiku kostnego, galarety Whartona oraz tkanki tłuszczowej mogą różnić się pomiędzy sobą w aspekcie ich kompozycji molekularnej oraz zdolności do różnicowania. Porównanie komórek MSCs pochodzących z wybranych w/w tkanek przedstawiono w Tabeli 1.

Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej (ang. *International Society for Cellular Therapy*, ISCT), w celu uporządkowania nomenklatury oraz zdefiniowania cech charakterystycznych dla ludzkich komórek MSCs, a także w celu łatwiejszego porównywania wyników badań pomiędzy laboratoriami na całym świecie, zaproponowało trzy minimalne kryteria charakteryzujące ludzkie komórki MSCs (79), które przedstawiono w Tabeli 2.

Tabela 1. Porównanie komórek MSCs pochodzących z trzech głównych źródeł: szpiku kostnego (BM-MSCs), tkanki tłuszczowej (AT-MSCs) oraz sznura pępowinowego (UC-MSCs). Oznaczenia: (+/-) Niska wydajność różnicowania. (#) Komórki UC-MSCs wykazują wyższy potencjał do różnicowania w kierunku komórek śródbłonna naczyniowego niż BM-MSCs. (*) Wzrost MSCs przy zachowaniu tych samych warunków ekspansji pomiędzy P0-P3.

		Rodzaj komórek			Referen- cje
		BM-MSCs	AT-MSCs	UC-MSCs	
Pochodzenie		Szpi- k kostny	Tkanka tłuszczowa	Galareta Whartona sznura pępowinowego	(41,62, 79)
Morfologia komórek		Wydłużone, wrzecionowate adherentne komórki o morfologii zbliżonej do fibroblastów			(48,65)
Profil antygenowy	Markery negatywne	CD11b, CD14, CD19a, CD34, CD45, CD79a, CD133, CD144, HLA-II, HLA-DR			(48,65,66 ,81)
	Markery pozytywne	CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, HLA-I, HLA-ABD			
Liczba dni w hodowli do momentu osiągnięcia pasażu 3*		25,0 ± 3,9	15,5 ± 0,7	26,7 ± 7,2	(65)
Maksymalny osiągalny pasaż		7	8	>10	(48)
Zdolność do różnicowania w komórki o cechach fenotypowych zbliżonych do:	osteoblastów	+	+	+	(48,49)
	chondrocytów	+	+	+	(48,49)
	adipocytów	+	+	+/-	(48,49)
	komórek śródbłonna	+	+	+ [#]	(50,55–58,76)
	kardiomiocytów	+/-	+	-	(51–55,77)
	komórek nerwowych	+	+	+	(71–76,78)

Tabela 2. Cechy charakterystyczne dla ludzkich komórek MSCs na podstawie zaleceń Międzynarodowego Towarzystwa Terapii Komórkowej (79).

L.p.		Cechy charakterystyczne komórek MSCs
1.	Zdolność do adhezji	Adhezja do plastikowych powierzchni naczyń hodowlanych w standardowych warunkach hodowli <i>in vitro</i>
2.	Profil antygenowy	<u>Markery pozytywne</u> : CD105, CD90 oraz CD73 (antygeny występują na powierzchni $\geq 95\%$ komórek) <u>Markery negatywne</u> : CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α lub CD19, HLA klasy II (antygeny występują na powierzchni $< 2\%$ komórek MSCs)
3.	Potencjał do różnicowania	Zdolność do różnicowania w osteoblasty, adipocyty oraz chondrocyty w standardowych pożywkach różnicujących w warunkach <i>in vitro</i>

Pomimo tego, że nie ma zdefiniowanych kryteriów charakterystycznych dla komórek MSCs pochodzenia mysiego, wyniki badań światowych wskazują, że komórki MSCs izolowane z mysich tkanek wykazują ekspresję następujących antygenów powierzchniowych: CD29, CD44, CD73, CD105, CD106 oraz Sca-1, przy równoczesnym braku antygenów charakterystycznych dla komórek śródbłónka oraz komórek krwiotwórczych (hematopoetycznych), w tym CD31, Ter-119, CD45, CD11b (82–84). Podobnie jak komórki ludzkie, MSCs izolowane z tkanek zwierzęcych również posiadają zdolność do adhezji do polistyrenowych powierzchni naczyń hodowlanych oraz zdolność do różnicowania do komórek pochodzenia mezodermalnego (82).

Dzięki licznym badaniom światowym wskazującym na stosunkowo szeroki potencjał komórek MSCs do różnicowania w różne typy tkanek, komórki te – stanowiące populację pozyskiwaną z tkanek dojrzałych, od lat cieszą się zainteresowaniem badaczy w kontekście ich potencjalnego wykorzystania w regeneracji tkanek (85–87).

1.4. Mechanizmy działania komórek MSCs w procesach regeneracji niedotlenionych tkanek

Multipotencjalne komórki MSCs wykazują wiele cech pożądanych z punktu widzenia ich potencjalnego wykorzystania w regeneracji uszkodzonych tkanek – nie tylko w transplantacjach autologicznych, ale również allogenicznych, dlatego też w ciągu ostatniej dekady, podejmowane są liczne badania mające na celu wyjaśnienie mechanizmów działania tych komórek podanych w miejsce uszkodzenia tkankowego.

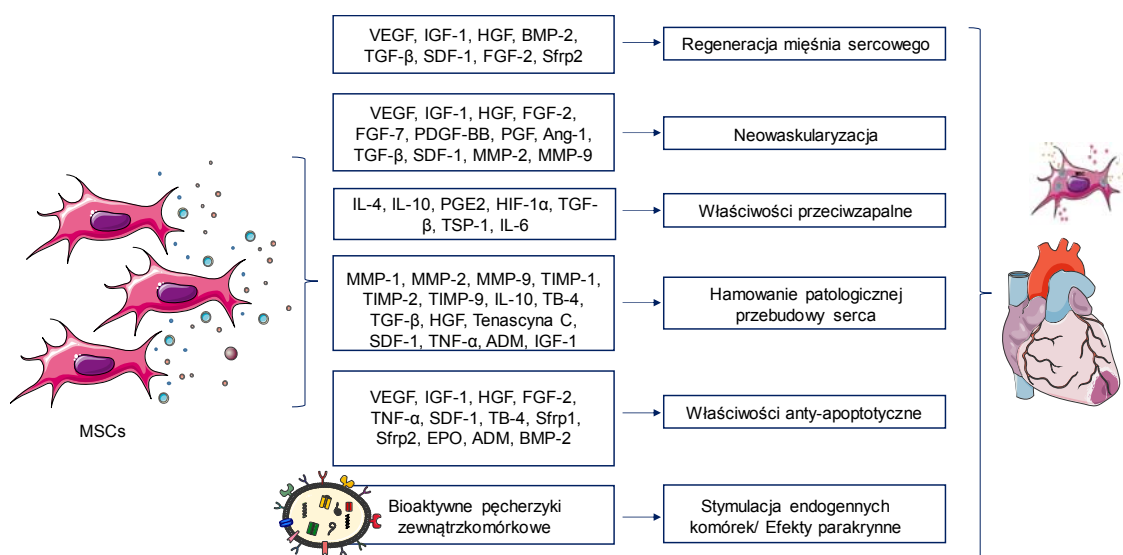
Pierwszy proponowany mechanizm działania komórek MSCs podanych w miejsce uszkodzenia tkankowego np. niedotlenionego mięśnia sercowego, opiera się na zdolności komórek MSCs do różnicowania w komórki dojrzałe, w tym komórki budujące mięsień sercowy, tj. w komórki o fenotypie kardiomiocytów (ang. *cardiomyocytes*, CMCs), komórki śródbłónka naczyń krwionośnych (ang. *endothelial cells*, ECs) oraz komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych (ang. *vascular smooth muscle cells*, VSMCs) (55,85–90). Toma i wsp. w badaniach *in vivo* wykazali, że komórki MSCs podane do mięśnia sercowego, po 14 dniach od podania wykazują fenotyp komórek różnicujących w

CMCs i ekspresję markerów kardiomiocytów takich jak m.in: łańcuch ciężki β -miozyny, α -aktyninę oraz sercową troponinę C, jednak wszczepienie tych komórek jest niewielkie (88). Z kolei *Makino i wsp.*, wyizolowali spośród komórek BM-MSCs różnicowanych w kierunku kardiomiocytów *in vitro*, komórki nie tylko wykazujące ekspresję markerów CMCs, ale także spontaniczne bijące, co może świadczyć o ich terminalnym przekształceniu się do dojrzałych komórek zdolnych podjąć właściwe dla nich funkcje (87). Pomimo, że komórki MSCs w warunkach *in vitro* wykazują potencjał do różnicowania w kierunku CMCs, na różnicowanie natywnych KM do komórek budujących tkanki uszkodzonego narządu w układzie *in vivo* ma istotny wpływ wiele innych czynników, w tym m.in. ich zdolność do zasiedlania uszkodzonego obszaru narządu, jak również żywotność tych komórek po podaniu (85,91).

Pomimo obserwowanej niskiej retencji KM w niedotlenionym mięśniu sercowym po ich podaniu, wyniki badań światowych wskazują m.in. na poprawę parametrów funkcjonalnych pracy serca, w tym objętości wyrzutowej lewej komory serca (ang. *left ventricular ejection fraction*, LVEF) oraz zahamowanie niekorzystnej przebudowy tkanek mięśnia sercowego (55,85,88,91). W związku z tym nasuwa się pytanie, czy poprawa funkcjonalna w obrębie uszkodzonego organu obserwowana po podaniu komórek MSCs jest spowodowana wyłącznie wszczepianiem i różnicowaniem komórek MSCs do komórek budujących określone tkanki i narządy i czy zależy również od innych mechanizmów?

W odpowiedzi na to pytanie, rosnąca liczba badań wskazuje na drugi proponowany mechanizm działania komórek MSCs, który oparty jest o ich właściwości immunomodulacyjne (92). Komórki MSCs, dzięki zdolności do wydzielania szeregu rozpuszczalnych cząsteczek, w tym interleukin i cytokin o charakterze przeciwzapalnym, które mogą modulować odpowiedź układu odpornościowego (93,94). Dla przykładu, IL-4 i IL-10 wydzielane przez komórki MSCs hamują proliferację limfocytów T (95), czynnik wzrostu hepatocytów (ang. *hepatocyte growth factor*, HGF) hamuje proliferację limfocytów T CD4⁺ (96), natomiast indukowana syntaza tlenu azotu oraz prostaglandyna E2 (ang. *prostaglandin E2*, PGE2) hamują proces zapalny (97,98).

Z kolei trzeci proponowany mechanizm działania komórek MSCs jest oparty o szerszą aktywność wydzielniczą tych komórek, polegającą na wydzielaniu szeregu cytokin, chemokin czy też czynników wzrostu - bezpośrednio do środowiska lub zamkniętych w postaci tzw. pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (ang. *extracellular vesicles*, EVs), które to bioaktywne cząsteczki mogą regulować parakrynnie szereg procesów biologicznych w miejscu przeszczepienia MSCs (99–101). Na Rycinie 4 przedstawiono listę przykładowych bioaktywnych cząsteczek wydzielanych przez komórki MSCs, które są istotne z punktu widzenia niniejszej pracy, wraz z przyporządkowaną im funkcją biologiczną, ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w niedokrwiennym uszkodzeniu tkanek (102).



Rycina 4. Aktywność parakryna komórek MSCs.

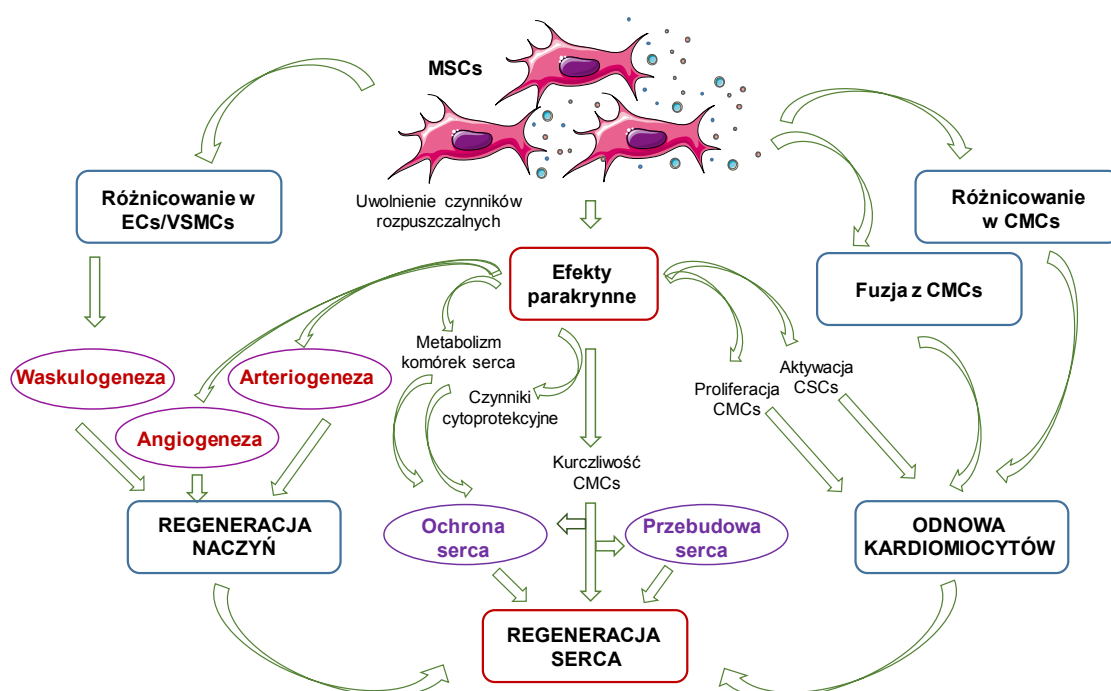
Komórki MSCs mogą wydzielać szereg czynników stymulujących regenerację uszkodzonych tkanek m.in. mięśnia sercowego (np. VEGF, IGF-1, HGF, SDF-1) oraz wpływających korzystnie na procesy neowaskularyzacji (np. VEGF, IGF-1, HGF, FGF-2, PDGF-BB, PGF), wykazujących właściwości przeciwzapalne (np. IL-4, IL-6, IL-10), hamujących patologiczną przebudowę serca (np. MMP-2, MMP-9). Przygotowano na podstawie (102), rycina własna.

Do czynników proangiogennych wydzielanych przez komórki MSCs należą m.in. czynniki wzrostu fibroblastów- 2 i 7 (ang. *fibroblast growth factor-2, 7*, FGF-2, FGF-7) stymulujące proliferację komórek ECs oraz VSMCs (96,100), płytkopochodny czynnik wzrostu BB (ang. *platelet-derived growth factor-BB*, PDGF-BB) stymulujący proliferację komórek VSMCs (100) oraz silnie proangiogenny czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (ang. *vascular endothelial growth factor*, VEGF) stymulujący m.in. proliferację komórek ECs, jak również ich migrację oraz tworzenie struktur nowych naczyń krwionośnych (96,103). Z kolei do czynników stymulujących przebudowę macierzy pozakomórkowej należą m.in. metaloproteinazy typu 1, 2 i 9 (ang. *metalloproteinase-1, 2, 9*, MMP-1, 2, 9) rozluźniające strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej, jak również aktywator plazimogenu oraz czynnik martwicy nowotworów- α (ang. *tumor necrosis factor- α* , TNF- α), które powodują degradację białek ECM (100). Osobną grupę czynników wydzielanych przez komórki MSCs stanowią cząsteczki zaangażowane w proliferację KM, ich przeżywalność oraz migrację do miejsca uszkodzenia tkankowego, do których należą m.in. FGF-2 stymulujący proliferację komórek ECs oraz komórek VSMCs (103), insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (ang. *insulin-like growth factor-1*, IGF-1) regulujący wzrost i różnicowanie komórek, a także hamujący apoptozę (96), czynnik komórek zrębu typu 1 (ang. *stromal cell-derived factor-1*, SDF-1) hamujący apoptozę oraz stymulujący migrację komórek (104), wydzielnicze białko spokrewnione z białkiem frizzled 2 (ang. *Secreted frizzled-related protein 2*, SFRP2) stymulujące przeżywalność kardiomiocytów w miejscu objętym niedotlenieniem *in vivo* (104).

Jak wspomniano wcześniej, komórki macierzyste, w tym komórki MSCs, mogą wydzielać także pęcherzyki zewnątrzkomórkowe – nanocząstki przenoszące szereg

bioaktywnych cząsteczek oraz zaangażowane w komunikację międzykomórkową (105), które szczegółowo opisano w dalszych rozdziałach.

Na Rycinie 5 przedstawiono podstawowe mechanizmy działania komórek MSCs uczestniczące w regeneracji mięśnia sercowego. Komórki MSCs podane w miejsce uszkodzenia tkankowego, np. powstałego na skutek zawału mięśnia sercowego, mogą stymulować regenerację uszkodzonego organu poprzez m.in. stymulację tworzenia nowych naczyń krwionośnych w sercu oraz odnowę puli kardiomiocytów (106). W przypadku odbudowy naczyń, komórki MSCs mogą bezpośrednio różnicować w komórki ECs lub komórki VSMCs (55,56,85,107), lub też korzystnie modulować proces angiogenezy (106). W procesach odbudowy puli kardiomiocytów, komórki MSCs mogą różnicować bezpośrednio w fenotyp identyfikowany, jako fenotyp kardiomiocytów (55,85–90) lub ulegać fuzji z endogennymi kardiomiocytami stymulując ich funkcje (108–110).



Rycina 5. Mechanizmy działania komórek MSCs uczestniczące w regeneracji mięśnia sercowego. Odnowa kardiomiocytów oraz regeneracja naczyń krwionośnych stanowią dwa podstawowe efekty regeneracyjne w tkankach serca, obserwowane po podaniu komórek MSCs. Najnowsze wyniki badań wskazują, że komórki MSCs uwalniają szereg czynników rozpuszczalnych, natomiast efekty parakryne wywierają istotny wpływ na regenerację uszkodzonego mięśnia sercowego poprzez aktywację endogennych mechanizmów naprawczych. Przygotowano na podstawie: (106); rycina własna.

Podane dosercowo komórki MSCs wykazują jednak przed wszystkim wysoką aktywność wydzielniczą i parakrynną, z którą to wiąże się większość efektów proregeneracyjnych i poprawiających strukturę i funkcję uszkodzonego organu po przeszczepieniu komórek MSCs (100,101,107,108,111,112). Bioaktywne cząsteczki wydzielane przez komórki MSCs podane w miejsce uszkodzenia mogą m.in:

- i) stymulować proliferację i różnicowanie endogennej populacji komórek progenitorowych rezydujących w sercu, tzw. KM serca (ang. *cardiac stem cells*, CSCs) w kierunku CMCs, a także wpływać na ich mobilizację do strefy objętej niedotlenieniem i strefy okołozawałowej (z doniesień literaturowych wynika, że w miejscu objętym zawałem obserwowano 2-krotne zwiększenie liczby komórek CSCs w grupie zwierząt, której podano komórki MSCs w odniesieniu do grupy kontrolnej zwierząt, natomiast w strefie okołozawałowej 150-krotne zwiększenie puli komórek CSCs w tej samej grupie zwierząt) (113),
- ii) stymulować proliferację kardiomiocytów, ich kurczliwość oraz pobudzać ich metabolizm *in vivo* (113),
- iii) wydzielać czynniki cytoprotekcyjne działające ochronnie na różne typy komórek tkanki sercowej, co zostało potwierdzone w badaniach *in vitro* oraz *in vivo* (101,111,114).

Wszystkie wymienione działania komórek MSCs mogą prowadzić do efektów ochronnych w endogennych tkankach, jak również promować korzystną przebudowę tego organu opartą o endogenne komórki (Rycina 5). Dodatkowo bioaktywne czynniki wydzielane przez komórki MSCs, wywierają efekt przeciwzapalny oraz antyapoptotyczny, co wszystko razem może zwiększać efekt regeneracyjny (97,98,100,101,107,108,111,112,115).

Badania potencjału regeneracyjnego komórek MSCs wykazały poprawę funkcji serca po ich podaniu, tj. wzrost frakcji wyrzutowej lewej komory (LK) oraz zmniejszenie obszaru blizny pozawałowej w zwierzęcym modelu zawału serca *in vivo* (112). Metaanaliza przeprowadzona przez grupę Profesora B. Dawn'a i uwzględniająca wyniki 48 randomizowanych prób klinicznych, obejmująca 2602 pacjentów z chorobą niedokrwienną serca, którym podano komórki szpiku kostnego, jako terapię komórkową, wykazała m.in. istotny statystycznie wzrost frakcji wyrzutowej LK serca, redukcję wielkości obszaru pozawałowego oraz złagodzenie niekorzystnej przebudowy tkanek serca (116). Biorąc pod uwagę ograniczoną jednak retencję KM podanych do mięśnia sercowego (117,118), coraz częściej postuluje się, że efekt terapeutyczny obserwowany po podaniu tych komórek jest spowodowany głównie ich aktywnością parakrynną (55,85,88,91).

Obserwowana poprawa frakcji wyrzutowej LK wynosząca średnio 2,92% ($p=95\%$) wydaje się stosunkowo niewielka (116), ale pomimo tego należy podkreślić fakt, że obserwowano 15% redukcję śmiertelności pacjentów włączonych do prób klinicznych, w których stosowano preparaty komórkowe szpiku kostnego (119). Należy tu mocno podkreślić, że dotychczasowe standardowe metody leczenia skutków zawału mięśnia sercowego – oparte głównie o metody interwencyjne i środki farmakologiczne – również skutkują porównywalną efektywnością poprawy parametrów funkcji serca (120,121). W tym kontekście należy spojrzeć z nadzieją na efekty uzyskiwane w terapii z zastosowaniem KM, w tym z dojrzałych tkanek, jako na obiecujące podejście terapeutyczne, mogące stanowić dodatkowy element do standardowych metod leczenia farmakologicznego, stosowanych dziś w chorobie niedokrwiennej serca.

1.5. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe

1.5.1. Klasyfikacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, mechanizmy powstania i ich skład molekularny

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. *extracellular vesicles*, EVs) są kulistymi strukturami składającymi się z fragmentu cytoplazmy - zawierającego charakterystyczne dla komórki rodzicielskiej białka, peptydy, RNA oraz DNA, otoczonego błoną lipidową (122,123). EVs stanowią heterogenną populację pęcherzyków uwalnianych przez różne typy komórek, w tym komórki zwierzęce, w warunkach fizjologicznych oraz po ich aktywacji (124–126). Biorąc pod uwagę parametr wielkości, wyróżnia się następujące frakcje EVs wydzielanych przez prawidłowe (nieapoptotyczne) komórki ssące: i) **mikrofragmenty błonowe** zwane także **ektosomami** (o wielkości w zakresie: ok. 100 - 1000 nm) oraz **egzosomy** (o średnicy: ok. 40 - 100 nm) (127,128). Poszczególne rodzaje EVs różnią się także między sobą biogenezą, co warunkuje m.in. ich zawartość molekularną odpowiadającą za funkcje biologiczne (129,130). Niezależną grupę EVs stanowią ciała apoptotyczne (o średnicy nawet powyżej 1000 nm) wydzielane przez komórki umierające na drodze apoptozy (131).

Najwięcej doniesień literaturowych opisuje obecnie mechanizmy powstania **egzosomów** (132). Egzosomy powstają poprzez wpuklenie błony do światła późnych endosomów nazywanych też ciałami wielopęcherzykowymi (ang. *multi-vesicular body*, MVB), a następnie uwolnienia nanocząstek poza błonę komórkową. Jeden z najlepiej opisanych mechanizmów powstania MVB, dowodzi, że w biogenezę MVB (a tym samym egzosomów) jest zaangażowany kompleks białkowy ESCRT (ang. *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) (132,133). Hessvik i wsp. przedstawili (na podstawie dostępnej literatury) listę około 40-u białek (np. TSG101, ALIX, syntenina-1, Rab35), lipidów (np. cholesterol) oraz modyfikacji warunków hodowli komórek (np. hipoksja, naświetlanie) zaangażowanych oraz modulujących biogenezę i uwalnianie egzosomów (134). Pomimo licznych badań dotyczących roli kompleksu białkowego ESCRT w biogenezie MVB, wciąż nie jest jasne czy poszczególne subpopulacje MVB przenoszą ładunek przeznaczony do degradacji w lizosomach, autofagosomach, czy też MVB ulegną fuzji z błoną komórkową, wskutek czego egzosomy zostaną wydzielone do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (133). Ostatnie doniesienia literaturowe wskazują, że potranslacyjna modyfikacja białek MVB polegająca na dołączaniu białka ISG15 działającego podobnie jak ubikwityna (z ang. *ISGylation*) - szczególnie indukowana w czasie infekcji, stresu oksydacyjnego, a także uszkodzeniem DNA oraz w starzejących się komórkach - może kierować MVB na ścieżkę degradacji w lizosomach (135,136).

Transport MVB do błony komórkowej jest zależny od ich interakcji z mikrofilamentami aktynowymi oraz mikrotubulami, które tworzą swoiste drogi transportu wewnątrzkomórkowego, po których odbywa się transport MVB za pośrednictwem białek motorycznych (137). Sekrecja egzosomów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, zachodzi w wyniku fuzji MVB z błoną komórkową, co z kolei następuje z udziałem transbłonowego kompleksu białkowego SNARE (ang. *soluble N – ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), w czym mogą pośredniczyć małe GTPazy (133,138).

Na powierzchni MVB znajduje się kompleks białkowy v-SNARE (ang. *vesicle SNARE*), podczas gdy na wewnątrzkomórkowej części plazmalemmy występują docelowe kompleksy białkowe t-SNARE (ang. *target SNARE*). Białka v-SNARE są rozpoznawane swoiście przez komplementarne białka t-SNARE, co umożliwia powstanie kompleksu fuzującego, a po przekroczeniu bariery energetycznej następuje fuzja błon i uwolnienie zawartości MVB – tj. egzosomów - do przestrzeni pozakomórkowej (139).

Jak wcześniej wspomniano, kompozycja molekularna egzosomów jest ściśle związana z mechanizmem ich powstania (129,130). Najlepiej opisaną grupę cząstek występującą w egzosomach stanowią białka zaangażowane w różne funkcje, takie jak m.in. formowanie MVB (m.in. TSG101, ALIX), transport błonowy i fuzję błon (m.in. aneksyna I, II, V, białka SNAP, białko RabGDI), białka wykazujące aktywność enzymatyczną (m.in. GTPazy, kinazy lipidowe), białka szoku cieplnego (m.in. Hsp70), białka zaangażowane w przewodzenie sygnałów (m.in. Erk2, syntenina-1) oraz tetraspaniny (m.in. CD63, CD81) uważane za markery egzosomów (140,141). Wyniki innej grupy badawczej wskazują, że następujące cząsteczki: syntenina-1, EHD4 (ang. *EH domain-containing protein 4*), aneksyna XI oraz cząsteczka ADAM10 (ang. *a disintegrin and metalloproteinase domain 10*) są molekułami występującymi specyficznie we frakcji egzosomów (142). Listę 100 białek najczęściej występujących w egzosomach można znaleźć w bazie danych ExoCarta, która stanowi swoiste kompendium wiedzy na temat molekularnej kompozycji egzosomów (143).

Kolejną grupę cząstek występujących w egzosomach stanowią lipidy takie jak m.in. cząsteczki rezydujące w błonach biologicznych - cholesterol, sfingolipidy, fosfolipidy, glicerofosfolipidy (144). W egzosomach występują także kwasy nukleinowe, takie jak DNA oraz cząsteczki należące do różnych klas RNA, w tym mRNA, mikroRNA oraz długie niekodujące RNA (ang. *long non-coding RNA*, lncRNA) (126,145,146).

W przeciwieństwie do egzosomów, większe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe - **ektosomy**, powstają wskutek uwypuklania się plazmalemmy do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co jest spowodowane dynamiką i zmianami w kompozycji składników białkowych i lipidowych w obrębie dwuwarstwy błony, które z kolei powodują zmiany elastyczności i asymetrii błony komórkowej, umożliwiając „złuszczenie” się pęcherzyków z powierzchni błony komórkowej (147). Reorganizacja ułożenia fosfolipidów w błonie komórkowej spowodowana jest m.in. uwolnieniem jonów Ca^{2+} z retikulum endoplazmatycznego, które inaktywują działania flipazy przy równoczesnej aktywacji działania flopazy i skramblazy, wskutek czego dochodzi do zmiany asymetrii ułożenia fosfolipidów pomiędzy obiema warstwami błony, a także następuje zerwanie wiązań pomiędzy włóknami cytoszkieletu aktynowego, a fosfolipidami błonowymi (147,148). Co więcej, jony Ca^{2+} aktywują kolejne enzymy - kalpainę (ang. *calpain*) i żelzolinę (ang. *gelsolin*), które mają zdolność do częściowej hydrolizy wiązań pomiędzy aktyną, a glikoproteinami błonowymi (149,150). Zmiany te zwiększają płynność błon i ułatwiają uwalnianie ektosomów bezpośrednio z powierzchni plazmalemmy.

Ektosomy są charakteryzowane głównie na podstawie obecności białek błonowych charakterystycznych dla komórek rodzicielskich (151,152), i tak np. ektosomy wydzielane przez komórki MSCs mogą posiadać na swojej powierzchni następujące antygeny: CD29, CD44, CD105 oraz Sca-1 (ten ostatni antygen - w przypadku ektosomów wydzielanych przez komórki mysie) (153,154). Wyniki badań światowych pokazują, że pęcherzyki te mogą przenosić wiele białek komórek rodzicielskich, takich jak m.in. białka błonowe i cytoplazmatyczne (155). Do białek przenoszonych przez ektosomy, które są zaangażowane w przekazanie sygnałów należą: receptory błonowe (m.in. CXCR4, receptor EGFR), cząsteczki adhezyjne (w tym integriny, np. Mac-1), chemokiny (m.in. CXCL4, CXCL4), czynniki wzrostu (m.in. TGF- β), białka ECM (m.in. fibronektyna) (156–158). Wśród cząsteczek przenoszonych przez ektosomy zidentyfikowano także metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (ang. *matrix metalloproteinases*, MMPs), a wśród nich cząsteczkę MMP-2, która jest uznawana za marker ektosomów (159). Co więcej, ektosomy wykazują także wzbogacenie w aktyninę-4 (ang. *actinin-4*) oraz mitofilinę (ang. *mitofilin*) (142), co może odróżniać je od frakcji egzozomów. Kolejną grupę związków budujących ektosomy stanowią lipidy. Najwyższy odsetek lipidów stanowią fosfolipidy - głównie fosfatydylocholina. W obrębie błony ektosomów występuje także sfingomielina, fosfatydyloetanolamina oraz fosfatydyloseryna (160). Biorąc pod uwagę transkryptom ektosomów, wykazano, że cząsteczki te mogą przenosić mRNA oraz miRNA (formy dojrzałe i prekursorowe) (161–163). W Tabeli 3 przedstawiono porównanie subpopulacji EVs – egzozomów oraz ektosomów.

Tabela 3. Porównanie populacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez prawidłowe komórki zwierzęce i ludzkie. Przygotowano na podstawie: (142,159,164,165).

Rodzaj EVs	Pochodzenie i mechanizm powstania	Wielkość [nm]	Białka markerowe	Skład molekularny
Egzosomy	Pochodzenie: szlak endosomalno- lizosomalny; powstają poprzez uwypuklenie błony do światła późnych endosomów, a następnie uwolnienia egzozomów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej na drodze egzocytozy (w wyniku fuzji MVB z błoną komórkową)	40 – 100	Tetraspaniny (CD9, CD63, <u>CD81</u>), <u>syntenina-1</u> , <u>EHD4</u> , <u>aneksyna XI</u> , <u>ADAM10</u> , Alix, Tsg101, aneksyny, flotyliny, GTPazy, integriny, białka szoku cieplnego	mRNA, miRNA, lncRNA, białka cytoplazmatyczne i błonowe, lipidy
Ektosomy	Pochodzenie: błona komórkowa; powstają poprzez odpęszczowanie błony komórkowej	100 – 1000	<u>MMP-2</u> , <u>aktynina-4</u> , <u>mitofilina</u> oraz integriny, glikoproteiny, receptory błonowe, MMPs, białka cytoszkieletu	mRNA, miRNA, lncRNA, białka cytoplazmatyczne i błonowe, lipidy

Międzynarodowe Towarzystwo Naukowe zajmujące się badaniami pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (ang. *International Society for Extracellular Vesicles*, ISEV), skupiające badaczy z całego świata, opublikowało listę przykładowych, referencyjnych grup białek, które mogą występować w egzosomach oraz w pełnej frakcji EVs, a które zaleca się stosować, jako markery identyfikujące te nanocząstki biologiczne (166). Grupy tych białek wraz z przykładami zostały wymienione w Tabeli 4.

Tabela 4. Kategorie białek oraz ich występowanie we frakcjach EVs (wraz z wybranymi przykładami – w nawiasach). Źródło: (166).

Kategoria białek:	Białka transbłonowe/ białka ECM związane z lipidami EVs	Białka cytoplazmatyczne	Białka przedziałów/ organelli wewnątrz- komórkowych	Białka pozakomórkowe
Opis	Występują w egzosomach i ektosomach; Egzosomy i ektosomy - wzbogacone w te białka		Niewystępujące w egzosomach/ rzadko występujące w ektosomach	Związane gł. z plazmalemą; zmienne występowanie w EVs; związane gł. z ektosomami
Przykłady	Tetraspaniny (CD9, CD63, CD81), integryny, cząstki adhezyjne, receptory czynników wzrostu, heterotrimeryczne białka G, białka wiążące fosfatydyloserynę	Białka endosomów, białka wiążące się do błony komórkowej (Tsg101, aneksyny, białka Rab), białka sygnałowe oraz cytoszkieletu (syntenina)	Białka reticulum endoplazmatycznego (Grp94, kalneksyna), białka aparatu Golgiego (GM130), białka mitochondrialne (cytochrom C), białka jądrowe (histony)	Acetylocholine-steraza, albumina, białka ECM (fibronektyna, kolagen)

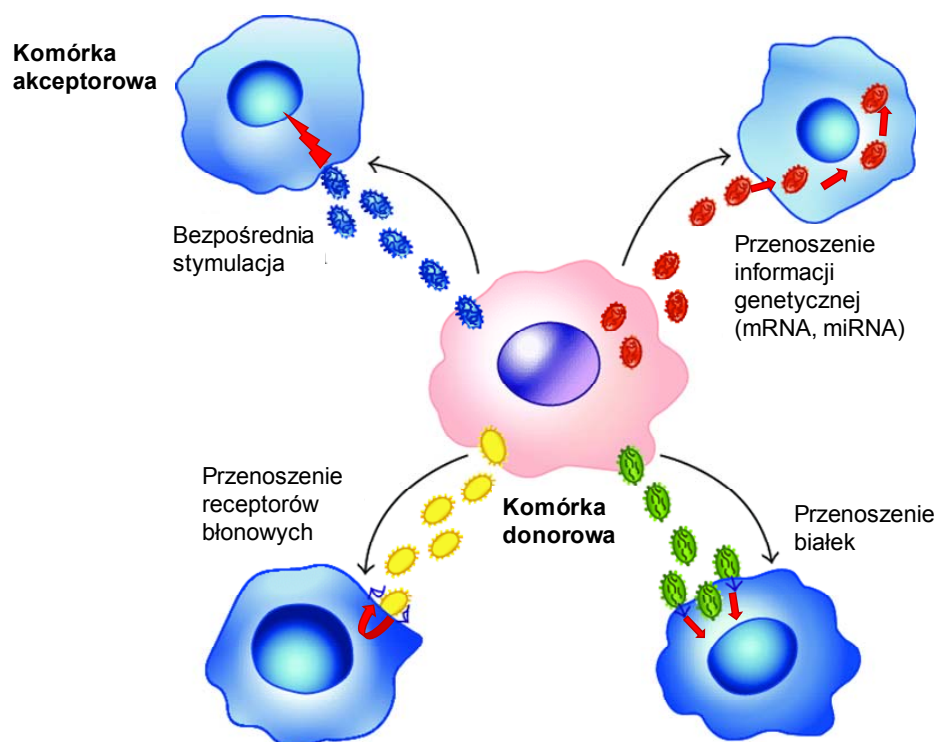
Towarzystwo Naukowe ISEV wydało także zalecenia dotyczące izolacji EVs oraz ich charakterystyki molekularnej oraz funkcjonalnej, co umożliwia przeprowadzenie porównywalnej identyfikacji EVs przez niezależne grupy badawcze na całym świecie oraz w efekcie umożliwia porównanie wyników przeprowadzonych badań (166,167).

1.5.2. Mechanizmy działania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

Frakcją EVs najwcześniej opisywaną w literaturze były mikrocząstki (ang. *microparticles*) wydzielane przez płytki krwi (168), ale już od wczesnych lat 2000 zaczęły pojawiać się coraz liczniejsze doniesienia wskazujące, że również inne komórki wydzielają nanopęcherzyki, które mogą przenosić bioaktywną zawartość (białka oraz mRNA) pomiędzy komórką donorową (rodzicielską), a komórką akceptorową (docelową),

wpływając w ten sposób na jej właściwości biologiczne (105). W związku z bioaktywnym ładunkiem przenoszonym przez EVs, nanocząstki te mogą modulować właściwości komórek docelowych na kilka sposobów, które zostały opisane poniżej.

Pierwszy mechanizm wymiany informacji za pośrednictwem EVs polega na bezpośredniej stymulacji komórki docelowej poprzez albo dostarczenie liganda wiążącego się do receptora w błonie komórki, bądź przez wiązanie aktywnego liganda występującego na powierzchni komórki akceptorowej, której efektem może być aktywacja komórki docelowej, w tym m.in. do wydzielania innych bioaktywnych cząsteczek (np. cytokin, czynników wzrostu) (169,170). Dla przykładu, EVs posiadające na swojej powierzchni cząsteczkę Mac-1 mogą wiązać się z płytkami krwi, powodując ich aktywację, a także nanocząstki te mogą aktywować komórki ECs (170,171). Drugi mechanizm działania EVs polega na przenoszeniu receptorów pomiędzy komórkami, i tak np. EVs wydzielane przez płytki krwi mogą przenosić receptor błonowy CD14 do błony komórek promonocytarnych, a także receptory adhezyjne m.in. CD54 do błony komórek ECs zwiększając tym samym ich właściwości adhezji (172). Kolejny, trzeci mechanizm działania EVs, polega na przenoszeniu białek enzymatycznych pomiędzy komórką rodzicielską dla EVs, a komórką docelową. Przykładowo, monocyty inkubowane z endotoksynami wydzielają EVs przenoszące kaspazę-1, a następnie nanocząstki te indukują apoptozę komórek VSMCs (173). Czwarty mechanizm działania EVs polega na horyzontalnym transferze informacji genetycznej pomiędzy komórkami. Przykładowo, EVs wydzielane przez mysie embrionalne komórki macierzyste mogą przenosić mRNA dla markerów komórek pluripotencjalnych do komórek docelowych, modulując ich właściwości biologiczne (105). EVs wydzielane przez te komórki mogą podnosić żywotność hematopoetycznych komórek macierzystych/ progenitorowych, wzmacniać ekspresję markerów charakterystycznych dla wczesnego etapu pluripotencji oraz markerów komórek hematopoetycznych, a także indukować fosforylację kinazy MAP p42/44 oraz białka Akt (105). Ponadto, EVs mogą przenosić liczne cząsteczki mikroRNA do komórek docelowych, a tym samym regulować translację określonych białek w tych komórkach (174). Podstawowe mechanizmy wymiany informacji pomiędzy komórką rodzicielską EVs, a komórką docelową przedstawiono na Rycinie 6.



Rycina 6. Mechanizmy komunikacji międzykomórkowej pomiędzy komórką donorową, a komórką akceptorową za pośrednictwem EVs.

Do głównych mechanizmów wymiany informacji pomiędzy komórką donorową (komórką rodzicielską, z której pochodzą EVs), a komórki akceptorową należą: i) bezpośrednia stymulacja komórki docelowej poprzez dostarczanie określonego liganda przez EVs lub wiązanie liganda występującego na powierzchni EVs, ii) przenoszenie receptorów powierzchniowych pomiędzy komórką donorową, a komórką akceptorową; iii) przenoszenie białek (m.in. enzymów, czynników transkrypcyjnych) pomiędzy komórką donorową, a komórką akceptorową; oraz iv) przenoszenie informacji genetycznej w postaci m.in. mRNA, miRNA z komórki donorowej do komórki akceptorowej. Przygotowano na podstawie: (175), zmodyfikowano.

Podsumowując, pęcherzyki zewnątrzkomórkowe uczestniczą w komunikacji międzykomórkowej i dzięki swej bioaktywnej zawartości, mogą modulować właściwości biologiczne komórek docelowych. Efekt funkcjonalny w komórkach docelowych jest uzależniony od bioaktywnego składu molekularnego EVs.

1.5.3. Funkcja i znaczenie biologiczne pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

Jak wspomniano wyżej, pęcherzyki zewnątrzkomórkowe odgrywają istotną rolę w komunikacji międzykomórkowej, tj. w wymianie informacji - w postaci bioaktywnych cząsteczek białek, lipidów i kwasów nukleinowych - pomiędzy komórkami donorowymi i komórkami akceptorowymi (105,176), powodując wpływ na funkcje biologiczne tych ostatnich. Efektem związania się EVs do komórki docelowej może być m.in. zmiana w ich aktywności proliferacyjnej, żywotności, metabolizmie, aktywności wydzielniczej, czy też ekspresji różnych genów związanych np. z procesami różnicowania (105,169,170,177).

Wymiana informacji za pośrednictwem EVs odbywa się nie tylko pomiędzy sąsiadującymi komórkami, ale dzięki swoim małym rozmiarom EVs wraz z płynami ustrojowymi mogą przemieszczać się na znaczne odległości, a następnie wiązać się do komórek docelowych w innych tkankach (176). Obecne wyniki badań światowych dostarczają nam wiedzy na temat charakterystyki biologicznej i molekularnej EVs występujących w wielu płynach ustrojowych, takich jak m.in. krew, mocz, płyn owodniowy, które to EVs posiadają cechy charakterystyczne dla komórek, z których pochodzą (178–180). Komunikacja międzykomórkowa za pośrednictwem EVs odgrywa istotną rolę w wielu procesach fizjologicznych. Przykładowo, w obrębie nisz KM, komórki stromalne wydzielają biologicznie aktywne EVs, które oddziałują m.in. z KM hematopoetycznymi, powodując utrzymanie stałej puli tych komórek w niszy, poprzez hamowanie ich apoptozy oraz utrzymanie potencjału różnicowania (181). Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, a szczególnie te pochodzące z komórek immunokompetentnych, mogą odgrywać także istotną rolę w przenoszeniu białek głównego kompleksu zgodności tkankowej i innych antygenów z powierzchni jednej do powierzchni drugiej komórki układu immunologicznego, a także pośredniczyć w prezentacji antygenów (182–184). Z kolei EVs wydzielane przez komórki epitelialne kanalików nerkowych (ang. *renal tubular epithelial cells*) mogą indukować pojawienie się markerów oraz cech charakterystycznych dla komórek nabłonkowych w komórkach MSCs (185).

Jak wspomniano we wcześniejszych rozdziałach, bioaktywne cząstki przenoszone przez EVs odzwierciedlają rodzaj komórek rodzicielskich, z których pochodzą te pęcherzyki. Dla przykładu, egzosomy wydzielane przez kardiomiocyty wykazują wzbogacenie w białka charakterystyczne dla sarkomerów (186) oraz odgrywają istotną rolę w komunikacji z komórkami śródbłoka serca, stymulując ich migrację, co może mieć istotne znaczenie dla procesów regeneracji uszkodzonego mięśnia sercowego m.in. poprzez indukcję neowaskularyzacji (187). Z kolei badania przeprowadzone przez nasz zespół wykazały, że EVs wydzielane przez mysie indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. *induced pluripotent stem cells*, iPS) mogą korzystnie modulować potencjał angiogeny komórek śródbłoka serca oraz wywierać na nie efekt cytoprotekcyjny *in vitro* (114).

Poza procesami fizjologicznymi, EVs odgrywają także istotną rolę w procesach towarzyszącym stanom patologicznym w naszym organizmie. Wyniki badań wykonanych w mysim modelu AMI, wykazały wzrost wydzielania EVs przez kardiomiocyty oraz komórki śródbłoka w następstwie uszkodzenia niedokrwiennego tego organu, a następnie ich wychwyt przez napływające monocyty (188). EVs wyizolowane z tkanek mięśnia sercowego objętego niedotlenieniem wywierały inny efekt biologiczny na komórki docelowe w porównaniu do EVs wyizolowanych z nieuszkodzonych tkanek mięśnia sercowego (188), co może świadczyć o odmiennym składzie molekularnym pęcherzyków wydzielanych w stanach fizjologicznych oraz patologicznych. W związku z tym, w ostatnim czasie prowadzone są badania EVs, jako potencjalnych biomarkerów chorób, które mogłyby pomóc szybciej zdiagnozować pewne schorzenia. W chwili obecnej w światowej bazie rejestrującej badania kliniczne - *ClinicalTrials.gov* - zarejestrowanych jest 9 badań, których celem jest m.in. charakterystyka krążących EVs wydzielanych przez

komórki wysepek Langerhansa w przebiegu cukrzycy, czy też w przebiegu choroby Alzheimera. Co więcej, również komórki nowotworowe wydzielają EVs, które mogą oddziaływać na komórki immunokompetentne i odgrywać rolę w rozwoju nowotworów i tworzeniu przerzutów (189), co stanowi odrębną ważną gałąź badawczą nad rolą EVs w komunikacji międzykomórkowej w warunkach prawidłowych i patologicznych.

1.5.4. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane przez komórki macierzyste i próby ich wykorzystania w regeneracji tkanek

Wyniki badań światowych koncentrujących się na procesach naprawy tkankowej, wykazały m.in. że EVs wydzielane przez KM mogą przenosić bioaktywną zawartość, która może wpływać na funkcje komórek docelowych, w tym m.in. proces regeneracji uszkodzonych tkanek (114,126,190). W chwili obecnej badacze na całym świecie podejmują liczne badania w badaniach przedklinicznych mające na celu określenie potencjału regeneracyjnego EVs pozyskiwanych z KM w wielu zwierzęcych modelach uszkodzeń tkanek i narządów, takich jak m.in. uszkodzenie nerek i wątroby, uszkodzenie płuc, udar mózgu, czy też niedotlenienie mięśnia sercowego (114,124,191–197). Wybrane zwierzęce modele *in vivo*, w których badano potencjał regeneracyjny EVs, ze szczególnym uwzględnieniem EVs wydzielanych przez komórki MSCs oraz informacją o dawce i schemacie podania EVs zamieszczono w Tabeli 5.

Badania przeprowadzone w mysim modelu uszkodzenia nerek indukowanych cisplatyną, wykazały, że MSC-EVs podawane dożylnie (*i.v.*) zwiększają przeżycie tych zwierząt, przy czym procent przeżywających zwierząt był wyższy w przypadku kilkukrotnego podania preparatów MSC-EVs w porównaniu do procentu przeżycia obserwowanego w przypadku podania jednokrotnego (191). Z kolei te same cząsteczki badane w modelu niedokrwienego uszkodzenia wątroby *in vivo*, powodowały korzystne obniżenie poziomu cytokin prozapalnych w osoczu zwierząt, co było skorelowane ze zmniejszeniem wartości markerów charakterystycznych dla uszkodzonej wątroby (w tym m.in. ALT, ASP) (192). Podobnie, efekt przeciwpalny mediowany przez MSC-EVs był obserwowany także w mysim modelu ostrego uszkodzenia płuc indukowanego endotoksynami bakteryjnymi (193). Co ciekawe, w literaturze można znaleźć także wyniki badań *in vivo*, które pokazują korzystny wpływ MSC-EVs na parametry neurologiczne mózgu myszy w mysim modelu udaru mózgu *in vivo*. Wyniki analiz przeprowadzonych na tkance mózgowej pobranej od tych zwierząt wykazały wyższą gęstość neuronów w obszarze niedokrwienia skorelowaną z wyższą proliferacją komórek w tym rejonie, potwierdzając równocześnie występowanie neurogenezy i angiogenezy w rejonie niedotlenienia mózgu (124). W modelu tym MSC-EVs podawane były dożylnie (124), co świadczy, że cząsteczki te ze względu na swoje małe rozmiary, mogą przenikać przez barierę krew- mózg. Biorąc pod uwagę zwierzęcy model ostrego zawału mięśnia sercowego (AMI), obserwowano poprawę funkcji skurczowej lewej komory serca, a także zmniejszenie obszaru blizny pozawałowej w następstwie podania EVs, w tym m.in. MSC-EVs (114,194–196). Opublikowane wyniki badań *in vivo* w modelu AMI, przedstawiają korzystny wpływ EVs wydzielanych przez różne populacje KM, które podawane były bezpośrednio do mięśnia sercowego (114,194–196). Nie mniej jednak, zdolność do internalizacji EVs przez komórki w warunkach *in vivo* w modelu AMI po ich podaniu

dożylnym, nie była dotąd przedstawiana w literaturze. Podanie domięśniowe preparatów opartych o KM lub ich pochodne, stanowi główną drogę podania. Jednak w przebiegu niektórych uszkodzeń tkankowych, jak np. udar mózgu, podanie bezpośrednie do rejonu uszkodzenia może być obciążone dużym ryzykiem powikłań. Dlatego też, bardzo ważne jest znalezienie alternatywnych oraz bezpieczniejszych dróg podania preparatów biologicznych, które będą mogły efektywnie promować efekty regeneracyjne uszkodzonych tkanek, w tym podania dożylnie lub dotętnicze, co stanowi przedmiot już prowadzonych badań (198).

Charakterystyka molekularna EVs wpływająca na ich oddziaływanie z komórkami docelowymi, w tym komórkami śródbłonna, jak również wyjaśnienie tego oddziaływania w oparciu o molekularną kompozycję EVs, nie były jak dotąd przedmiotem pogłębionych analiz w mysim modelu AMI oraz LI. Chociaż w literaturze można znaleźć doniesienia przedstawiające charakterystykę molekularną EVs na poziomie białka (190) lub mikroRNA (126), jednak nie ma prac przedstawiających dogłębną wieloaspektową analizę MSC-EVs, skorelowaną z jej wpływem na właściwości funkcjonalne komórek docelowych *in vitro*. Co więcej, zasadne wydaje się także sprawdzenie ich potencjału regeneracyjnego w wybranych modelach uszkodzeń niedokrwiennych tkanek, w tym AMI i LI (ze szczególnym uwzględnieniem innej drogi podania niż podanie domięśniowe) oraz wskazanie potencjalnych mechanizmów działania tych cząsteczek w oparciu o ich skład molekularny oraz zmiany obserwowane na poziomie histologicznym oraz biochemicznym po podaniu preparatów EVs *in vivo*.

Tabela 5. Próby wykorzystania EVs w regeneracji uszkodzonych tkanek *in vivo*.

Model <i>in vivo</i> uszkodzenia tkankowego	Rodzaj EVs, dawka i droga podania	Obserwowane efekty regeneracyjne	Referencja
Uszkodzenie nerek indukowane cisplatyną (ang. <i>Cisplatin-induced acute kidney injury</i>)	BM-MSC-EVs 6 podań <i>i.v.</i> : 1-sze podanie: 100 µg, kolejne podania: 50 µg	<u>Podanie jednokrotne EVs:</u> - zwiększone przeżycie myszy o 40% - poprawa czynności nerek - w ocenie histologicznej brak oznak uszkodzenia nerek <u>Podanie wielokrotne EVs:</u> - zwiększone przeżycie myszy o 80% - znaczna poprawa czynności nerek - w ocenie histologicznej brak oznak uszkodzenia nerek	(191)
Niedokrwiennie uszkodzenie wątroby (ang. <i>hepatic ischemia reperfusion</i>)	BM-MSC-EVs, 1-o podanie <i>i.v.</i> 2x10 ¹⁰ cząstek	- zmniejszenie wartości ekspresji markerów charakterystycznych dla uszkodzonej wątroby (m.in. ALT, AST, ALP, kreatyniny) - zmniejszenie obszaru nekrozy tkanek - obniżenie poziomu cytokin prozapalnych w osoczu	(192)
Ostre uszkodzenie płuc	BM-MSC-EVs 1-o podanie <i>i.v.</i> dawka: EVs	- zmniejszenie obrzęku płuc - redukcja napływu komórek układu odpornościowego do miejsca uszkodzenia	(193)

indukowane bakteryjnymi endotoksynami (ang. <i>endotoxin-induced acute lung injury</i>)	wydzielone przez 3×10^6 komórek		
Udar mózgu (ang. <i>stroke</i>)	BM-MSC-EVs 1-o podanie <i>i.v.</i> dawka: EVs wydzielone przez 2×10^6 komórek	- poprawa parametrów neurologicznych - wyższa gęstość neuronów w obszarze niedokrwienia skorelowana z wyższą proliferacją komórek w tym rejonie - występowanie neurogenezy i angiogenezy w rejonie uszkodzenia	(124)
Ostry zawał mięśnia sercowego (ang. <i>acute myocardial infarction</i>)	BM-MSC-EVs, 1-o podanie <i>i.m.</i> dawka: 80 µg, wydzielone przez 2×10^6 komórek	- zmniejszenie obszaru zawału - poprawa ukrwienia niedotlenionych obszarów poprzez stymulację angiogenezy w tych obszarach	(194)
	iPS-EVs, 1-o podanie <i>i.m.</i> dawka: 100 µg	- poprawa funkcji LK serca (m.in. frakcji wyrzutowej) - zmniejszenie obszaru blizny pozawałowej - zatrzymanie niekorzystnej przebudowy tkanek serca	(114)
	CPC-EVs, 1-o podanie <i>i.m.</i> dawka: 300 µg	- poprawa funkcji LK serca (m.in. frakcji wyrzutowej) - zahamowanie apoptozy kardiomiocytów - zmniejszenie rozmiaru blizny pozawałowej - stymulacja angiogenezy w obszarze objętym niedotlenieniem	(195)
	MSC-egzosomy 1-o podanie <i>i.v.</i> dawka: 0,4 µg/ 1 ml buforu infuzyjnego	- poprawa funkcji skurczowej LK serca (m.in. frakcji wyrzutowej) - zahamowanie apoptozy kardiomiocytów - zmniejszenie rozmiaru blizny pozawałowej - przywrócenie fizjologicznego poziomu ATP/ADP oraz NADH/NAD ⁺ , a także redukcja stresu oksydacyjnego w komórkach tkanki mięśnia sercowego (ochrona przed uszkodzeniem spowodowanym reperfuzją)	(196)

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane przez KM budzą coraz większe zainteresowanie w kontekście ich potencjalnego wykorzystania w regeneracji uszkodzonych tkanek, w tym w chorobach niedokrwiennych. Badania w tym zakresie stanowią rozwijającą się obecnie dziedzinę badań i stawiają badaczom nowe wyzwania merytoryczne oraz metodologiczne.

Niewątpliwie główną zaletą EVs jest fakt, że są one nośnikami bioaktywnych cząstek takich jak: białka, mRNA, mikroRNA. W związku z tym, EVs mogą oddziaływać aktywnie na komórki docelowe modulując ich funkcje. Wykorzystanie EVs w nowych podejściach regeneracyjnych może być bezpieczniejsze od stosowanych dotychczas podań całych komórek, szczególnie w tkankach, do których dotarcie jest utrudnione oraz może nieść dodatkowe ryzyko uszkodzenia, jak np. w przypadku tkanek mózgu lub serca. W tym kontekście, poznanie charakterystyki molekularnej oraz biologicznej populacji EVs wydzielanych przez KM, w tym MSCs, oraz scharakteryzowanie ich oddziaływania na komórki docelowe w modelach *in vitro* i *in vivo*, może dostarczyć cennych informacji na temat możliwych przyszłych zastosowań tych preparatów w regeneracji uszkodzonych tkanek.

W związku z powyższym, w niniejszej pracy doktorskiej podjęto badania mające na celu pogłębioną charakterystykę molekularną bioaktywnych MSC-EVs w aspekcie przenoszonych przez nie cząsteczek, które mogą być zaangażowane w procesy regeneracji uszkodzonych tkanek, jak również zbadanie internalizacji MSC-EVs przez komórki docelowe w modelu *in vitro* i *in vivo* oraz poznanie potencjału regeneracyjnego MSC-EVs w modelach niedokrwiennego uszkodzenia tkanek *in vivo*.

2. CELE PRACY

Głównym celem badań realizowanych w ramach niniejszej pracy doktorskiej była ocena fenotypu, składu molekularnego oraz aktywności biologicznej, w tym potencjału regeneracyjnego pęcherzyków zewnątrzkomórkowych uwalnianych przez mysie mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego, w kontekście ich potencjalnej możliwości zastosowania w regeneracji tkanek uszkodzonych w wyniku niedotlenienia *in vivo*.

Do szczegółowych celów badawczych należało:

1. Oczyszczenie mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez mysie antygenowo-zdefiniowane mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs) szpiku kostnego w hodowli *in vitro* (preparaty MSC-EVs).
2. Zbadanie morfologii, wielkości i fenotypu wieloantygenowego uzyskanych preparatów MSC-EVs zgodnie z zaleceniami Towarzystwa Naukowego *ISEV* (166).
3. Zbadanie składu molekularnego MSC-EVs na poziomie białka, mRNA oraz miRNA.
4. Zbadanie wpływu MSC-EVs na wybrane funkcje biologiczne mysich komórek śródbłónka naczyń serca (MCEC) *in vitro*, w tym na ich przeżywalność w warunkach niedotlenienia oraz stanu zapalnego, a także potencjał angiogeny i poziom aktywacji w środowisku zapalnym.
5. Zbadanie retencji MSC-EVs podawanych dożylnie, w organach objętych uszkodzeniem niedokrwiennym *in vivo*, w tym w mysich modelach: a) ostrego zawału mięśnia sercowego z uszkodzeniem wywołanym ischemią i reperfuzją (ang. *acute myocardial infarction*; AMI; *ischemia/ reperfusion injury*; I/R), oraz b) uszkodzenia niedokrwiennego kończyny (ang. *limb ischemia*, LI).
6. Zbadanie potencjału regeneracyjnego MSC-EVs *in vivo*, w przedklinicznych modelach niedokrwiennego uszkodzenia tkanek, w tym: a) ostrego zawału mięśnia sercowego u myszy z uszkodzeniem wywołanym ischemią i reperfuzją (AMI; I/R), oraz b) uszkodzenia niedokrwiennego kończyny (LI).

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiał badawczy

3.1.1. Zwierzęta

Materiał wyjściowy do wyprowadzenia hodowli mysich mezenchymalnych komórek macierzystych (ang. mesenchymal stem/stromal cells, MSCs) oraz wykorzystany w kolejnych etapach przygotowywania preparatów pęcherzyków zewnątrzkomórkowych otrzymanych z hodowli komórek MSCs (MSC-EVs) - stanowił **mysi szpik kostny** izolowany z kości udowych oraz piszczelowych myszy następujących szczepów: 1) C57Bl/6J (szczep dziki) oraz 2) C57Bl/6-Tg(GFP)J (szczep transgeniczny wykazujący endogenną ekspresję znacznika eGFP we wszystkich komórkach). Myszy obu szczepów w wieku 8-10 tygodni kupowano od hodowcy Charles River (Animalab) lub pozyskiwano z hodowli własnej Zwierzętarni Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Doświadczenia związane z wykorzystaniem zwierzęcego materiału biologicznego zostały wykonane za zgodą I Lokalnej Komisji Bioetycznej w Krakowie (Uchwała nr 183/2012).

Badania potencjału regeneracyjnego MSC-EVs otrzymanych z hodowli komórek MSCs prowadzono w dwóch modelach zwierzęcych *in vivo*:

- 1) Mysim modelu ostrego zawału mięśnia sercowego (ang. *acute myocardial infarction*, AMI). Doświadczenia - z udziałem 12-14 tygodniowych myszy szczepu C57Bl/6J (szczep dziki) - wykonane zostały w instytucji współpracującej: *Cardiovascular Research Institute, University of Kansas Medical Center, Kansas City, KS, USA*, na podstawie protokołów zaakceptowanych przez *American Association for Laboratory Animal Science* (no. 2015-2269 oraz 2015-2269.12);
- 2) Mysim modelu niedokrwienego uszkodzenia kończyny (ang. *limb ischemia*, LI). Doświadczenia - z udziałem 10-13 tygodniowych myszy szczepu C57Bl/6J (szczep dziki) - wykonane zostały w instytucji współpracującej: *INSERM, U1063, Stress Oxydant et Pathologies Métaboliques, Institut de Biologie en Santé, Université d'Angers, Angers, Francja*, zgodnie z zastosowaniem zatwierdzonych protokołów instytucjonalnych (no. CEEA.2012.125).

3.1.2. Hodowle komórkowe

3.1.2.1. Izolacja oraz hodowla komórek MSCs

Komórki MSCs izolowano z mysiego szpiku kostnego zgodnie z protokołem opublikowanym przez *Soleimani i Nadri* (199) z niewielkimi modyfikacjami, zgodnie z poniższą procedurą.

Szpik kostny izolowano z kości udowych oraz piszczelowych kończyn myszy szczepu C57Bl/6J oraz C57Bl/6-Tg(GFP)J poprzez wypłukanie jam szpikowych za pomocą pożywki hodowlanej DMEM/F12 (Sigma-Aldrich) umieszczonej w strzykawce o obj. 1 ml z igłą (Polfa Lublin). Wypłukaną półpłynną tkankę szpiku aspirowano

kilkukrotnie do strzykawki celem doprowadzenia komórek do jednolitej zawiesiny, którą następnie umieszczano w probówce kolekccyjnej (o objętości 15 lub 50 ml; BD Falcon) po wcześniejszym przefiltrowaniu przez filtr Ø 70 µm (BD Falcon) i odwirowano z prędkością 350xg, przez 6 min. w temp. pokojowej przy użyciu wirówki Eppendorf 5810R (Eppendorf). Pelet komórkowy zawieszano w świeżej pełnej pożywce DMEM/F12 suplementowanej 10% bydlęcą surowicą płodową (ang. *fetal bovine serum*, FBS; Sigma-Aldrich) i umieszczano na lodzie.

Kości pozostałe po wypłukaniu tkanki szpikowej fragmentowano mechanicznie i trawiono następnie enzymatycznie w mieszaninie kolagenazy I i II (o stężeniu końcowym: 1 mg/ml każda, ThermoFisher Scientific) przez 90 min. w temp. 37°C. Po trawieniu, enzymy inaktywowano poprzez dodanie 5-krotnej objętości pożywki DMEM/F12 z 10% FBS (Sigma-Aldrich), a następnie całość przenoszono przez filtr Ø 70 µm (BD Falcon) do nowej probówki wirowniczej celem usunięcia niestrawionych tkanek. Zawiesinę uwolnionych komórek odwirowywano z prędkością 350xg, przez 6 min. w temp. pokojowej przy użyciu wirówki Eppendorf 5810R (Eppendorf). Pelet komórkowy zawieszano w świeżej pożywce DMEM/F12 z 10% FBS (Sigma-Aldrich), a następnie łączono z zawiesiną komórek szpiku kostnego wyizolowanych w pierwszym etapie.

Komórki następnie wysiewano na naczynia hodowlane typu BD Primaria (75 cm², dedykowane hodowlom pierwotnym, BD Falcon), w gęstości 40 x 10⁶ wyizolowanych komórek/ 75 cm² powierzchni hodowlanej, w 20 ml pożywki DMEM/F12 z 10% FBS (Sigma-Aldrich) oraz z dodatkiem mieszaniny antybiotyków: penicyliny (st. końcowe: 100 U/ml) oraz streptomycyny (st. końcowe: 100 µg/ml; ThermoFisher Scientific). Hodowlę wstępną prowadzono w inkubatorze CO₂ przeznaczonym do hodowli komórek eukariotycznych (Mettler, Indiamart), w temp. 37°C w atmosferze zawierającej 21% O₂ i 5% CO₂, przez 72h bez zmiany pożywki, ponieważ komórki MSCs pozyskiwano poprzez adhezję do polistyrenowych powierzchni naczyń hodowlanych. Po 72h hodowli wszystkie nieadherentne komórki usuwano z hodowli poprzez zmianę całości pożywki. Frakcja adherentna komórek zawierająca komórki MSCs była nadal namnażana do momentu osiągnięcia 80-90% konfluencji, kiedy to komórki pasażowano.

W tym celu usuwano pożywkę hodowlaną, komórki dwukrotnie przepłukiwano 10 ml roztworu soli PBS bez jonów Ca²⁺, Mg²⁺ (HyClone, GE Healthcare Life Sciences), a następnie inkubowano w obecności 2 ml 0,25% roztworu trypsyny z EDTA (ThermoFisher Scientific) do momentu zaokrąglenia się i oderwania się pierwszych komórek MSCs od powierzchni plastiku hodowlanego. Wtedy komórki zalewano 10 ml pełnej pożywki hodowlanej (DMEM/F12 z 10% FBS; Sigma-Aldrich), pipetowano kilkakrotnie celem uwolnienia komórek do zawiesiny i całość przenoszono do probówek kolekcyjnych 15 lub 50 ml (BD Falcon). Komórki odwirowywano z prędkością 350xg, przez 6 minut w temp. pokojowej przy użyciu wirówki Eppendorf 5810R (Eppendorf). Komórki wysiewano na nowe naczynia hodowlane typu BD Primaria w stosunku ilościowym 1:2 w celu dalszego namnażania. Hodowlę prowadzono do 6 pasażu (P6).

Celem ujednolicenia wyników badań i zminimalizowania różnic wynikających z jednej strony z heterogenności frakcji komórek na wczesnych etapach hodowli, a z drugiej

strony m.in. z postępującego starzenia się komórek w hodowlach pierwotnych, w niniejszej pracy wykorzystywano komórki MSCs znajdujące się pomiędzy pasażem 4, a pasażem 6 hodowli (P4-P6).

3.1.2.2. Hodowla mysich komórek śródbłonka serca (MCEC)

Mysie komórki śródbłonka serca (ang. *mouse cardiac endothelial cells*, MCEC) zakupiono z firmy CELLutions Biosystems Inc. i hodowano na płytkach Ø 10 cm lub Ø 6 cm (BD Falcon) opłaszczonych roztworem żelatyny (st. końcowe: 0,1%, Sigma-Aldrich) w pożywce DMEM (zawierającej 4500 mg/L glukozy, 0,584 g/L L-glutaminy, 3,7 g/L wodorowęglanu sodu oraz bez dodatku pirogronianu sodu; Sigma-Aldrich) suplementowanej: 10 mM buforem HEPES (HyClone, GE Healthcare Life Sciences), 5% FBS (Sigma-Aldrich) oraz mieszaniną penicyliny (st. końcowe: 100 U/ml) oraz streptomycyny (st. końcowe: 100 µg/ml; ThermoFisher Scientific). Hodowlę prowadzono w inkubatorze CO₂ przeznaczonym do hodowli komórek eukariotycznych (Mettler, Indiamart), w temp. 37°C, w atmosferze zawierającej 21% O₂ i 5% CO₂.

W momencie osiągnięcia przez komórki 80% konfluencji wykonywano pasaż komórek. W tym celu pożywkę usuwano z hodowli, komórki dwukrotnie przepłukiwano roztworem soli PBS bez jonów Ca²⁺, Mg²⁺ (HyClone, GE Healthcare Life Sciences), a następnie pasażowano przy użyciu roztworu TrypLE Select Enzyme 1X (ThermoFisher Scientific). Komórki odwirowywano z prędkością 300xg, przez 5 min. w temp. pokojowej, przy użyciu wirówki Eppendorf 5810R (Eppendorf). Komórki wysiewano na nowe naczynia hodowlane opłaszczonych żelatyną (st. końcowe: 0,1%, Sigma-Aldrich), w stosunku ilościowym 1:5.

3.1.3. Izolaty pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek MSCs (MSC-EVs)

Kolejny kluczowy materiał badawczy wykorzystywany w niniejszej pracy stanowiły pęcherzyki zewnątrzkomórkowe wydzielane przez mysie komórki MSCs szpiku kostnego (tj. MSC-EVs). Procedury pozyskiwania, oczyszczania oraz charakteryzacji morfologicznej oraz molekularnej MSC-EVs opisano w dalszej części tego rozdziału.

3.2. Metody i protokoły analityczne

3.2.1. Analiza morfologii i profilu antygenowego komórek MSCs

W celu oceny morfologii komórek MSCs, komórki poddawano codziennej obserwacji przy użyciu mikroskopu świetlnego Olympus IX81 (Olympus) z kontrastem faz, wyposażonego w kolorową kamerę MicroPublisher 3.3 RTV. W celu dokładnej analizy zmian morfologii komórek w czasie hodowli, każdorazowo wykonano zdjęcia tych komórek.

Komórki MSCs (na pasażu 4-6) poddawano analizie z zastosowaniem cytometrii przepływowej. W tym celu, po speletowaniu komórek po pasażu, komórki płukano

roztworem soli PBS bez jonów Ca^{2+} , Mg^{2+} (HyClone, GE Healthcare Life Sciences), a następnie zawieszano w pożywce DMEM/F12 suplementowanej 2% FBS (Sigma-Aldrich) stanowiącej optymalne środowisko do przyżyciowego barwienia immunofluorescencyjnego komórek MSCs. Komórki rozdzielano następnie do próbek cytometrycznych (BD Falcon) o objętości 5 ml (2×10^5 komórek/próbkę), a następnie barwiono specyficznymi przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko następującym antygenom powierzchniowym: CD45, CD29, CD44, CD90, CD105, Sca-1, VEGFR2 (CD309), CD63, CD81, SSEA-1, CD11b, CD45R, c-kit (CD117), Tie-2 (CD202b), CD31, CD62E, TCR β chain, $\gamma\delta$ T-Cell Receptor, HGFR, CD184 (CXCR4), CD11a/CD18, CD49d, CD49e, CD54, CD106, CD62P, CD162, CD98, CD104 oraz CD147 (opisanymi w Tabeli 6) przez 30 min., na lodzie, bez dostępu światła. Po barwieniu komórki płukano objętością 3 ml roztworu soli PBS bez Ca^{2+} , Mg^{2+} (HyClone, GE Healthcare Life Sciences) i odwirowywano z prędkością 350xg, przez 6 min. w temp. pokojowej przy użyciu wirówki Eppendorf 5810R (Eppendorf). Komórki zawieszano w pożywce DMEM/F12 suplementowanej 2% FBS (Sigma-Aldrich) i analizowano przy użyciu cytometru przepływowego BD LSR Fortessa (BD Bioscience) w celu identyfikacji antygenów występujących na powierzchni komórek MSCs.

Tabela 6. Lista przeciwciał wykorzystanych do analizy cytometrycznej komórek MSCs.

Przeciwciało przeciwko antygenowi	Fluorochrom	Klon	Producent
CD11a/CD18	APC	H155-78	Biolegend
CD11b	PE	M1/70	BD Biosciences
CD29	APC	HM β 1-1	Biolegend
CD31	PE	MEC13.3	Biolegend
CD44	APC	IM7	Biolegend
CD45	FITC PE	30-F11	BD Biosciences
CD45R	PE	RA3-6B2	BD Bioscience
CD49d	APC	R1-2	Biolegend
CD49e	Alexa Fluor 488	5H10-27	Biolegend
CD54	APC	YN1/1.7.4	Biolegend
CD62E	PE	10E9.6	BD Biosciences
CD62P	Alexa Fluor 647	RB40.34	BD Biosciences
CD63	PE	NVG-2	BD Biosciences
CD81	PE	Eat2	BD Biosciences
CD90	PE	30-H12	Biolegend
CD98	Alexa Fluor 647	RL388	Biolegend
CD104	FITC	346-11A	Biolegend
CD105	APC	MJ7/18	Biolegend
CD106	APC	429	Biolegend
CD117 (c-kit)	PE	2B8	BD Biosciences
CD147	FITC	RL73	eBioscience
CD162	Alexa Fluor 647	2PH1	BD Biosciences
CD184	Alexa Fluor 647	L276F12	Biolegend

CD202b (Tie-2)	APC	TEK4	Biolegend
CD309 (VEGFR2)	APC	89B3A5	Biolegend
c-Met (HGFR)	PE	eBiolclone 7	eBioscience
Sca-1	PE	E13-161.7	BD Biosciences Biolegend
SSEA-1	PE	MC-480	Biolegend
$\gamma\delta$ T-Cell Receptor	PE	GL3	BD Biosciences
TCR β Chain	PE	H57-597	BD Biosciences

3.2.2. Analiza żywotności komórek

Żywotność komórek MSCs, które były źródłem EVs i z nad których zbierano pożywki kondycjonowane, jak również komórki MCEC - poddawane stymulacji cytokinami prozapalnymi oraz MSC-EVs (*procedury opisane poniżej*), każdorazowo analizowano z zastosowaniem cytometrii przepływowej, przy użyciu komercyjnego zestawu *Annexin V Apoptosis Detection Kit* (BD Bioscience) zgodnie z instrukcją dołączoną przez producenta.

W skrócie, po pasażu komórki odwirowano z prędkością 300xg, przez 6 min. w temp. pokojowej przy użyciu wirówki Eppendorf 5810R (Eppendorf). Nadsącz usuwano, a następnie komórki zawieszano w 20 ml roztworu soli PBS bez jonów Ca^{2+} , Mg^{2+} (HyClone, GE Healthcare Life Sciences) i wirowano prędkością 300xg, przez 6 min. w temp. pokojowej przy użyciu wirówki Eppendorf 5810R (Eppendorf). Następnie, komórki zawieszano w roztworze *1X Binding Buffer* w gęstości 10^6 komórek/ml. Po 100 μl zawiesiny komórek zawierającej 10^5 komórek przenoszono do nowych probówek cytometrycznych (BD Falcon). Do właściwej probówki do analizy dodawano 5 μl Aneksyny V oraz 5 μl jodku propidyny (ang. *propidium iodide*, PI) – znajdujących się w zestawie. Do próbek przygotowywanych w celu wykonania kompensacji kolorów, dodawano 2 μl Aneksyny V lub 2 μl PI. Zawartość probówek mieszano, a następnie inkubowano przez 15 min., w temp. pokojowej, bez dostępu światła. Po zakończonym barwieniu, do każdej probówki dodawano po 400 μl roztworu *1X Binding Buffer*. Bezpośrednio po wybarwieniu, komórki analizowano przy użyciu cytometru przepływowego BD LSR Fortessa (Becton Dickinson).

Zastosowany schemat analizy wykorzystujący barwienie jąder komórkowych w martwych komórkach za pomocą barwnika PI oraz wiązanie Aneksyny V do fosfatydyloseryny na powierzchni komórek apoptotycznych, umożliwił nie tylko ocenę odsetka komórek żywych (Aneksyna V⁻/ PI⁻) w hodowli, ale także na identyfikację komórek wczesnoapoptotycznych (Aneksyna V⁺/ PI⁻), późnoapoptotycznych (Aneksyna V⁺/ PI⁺) oraz nekrotycznych (Aneksyna V⁻/ PI⁺).

3.2.3. Analiza cyklu komórkowego

Komórki MSCs poddawano także analizie z zastosowaniem cytometrii przepływowej w celu oceny ich aktywności proliferacyjnej i rozkładu populacji w poszczególnych fazach cyklu komórkowego.

W tym celu, zawieszając komórki MSCs (w liczbie 1×10^6) wirowano z prędkością 350xg, przez 5 min., w temp. pokojowej przy użyciu wirówki Eppendorf 5810R (Eppendorf), a następnie pelet zawieszano w 500 μ l soli PBS bez Ca^{2+} , Mg^{2+} (HyClone, GE Healthcare Life Sciences). W kolejnym etapie dodawano 1 ml zmrożonego (-20°C) 70% etanolu (POCH) mieszając próbkę. Komórki utrwalano przez 60 min., na lodzie, a następnie dodawano 4 ml roztworu soli PBS bez jonów Ca^{2+} , Mg^{2+} (HyClone, GE Healthcare Life Sciences) i całość wirowano z prędkością 400xg, przez 10 min., w temp. pokojowej przy użyciu wirówki Eppendorf 5810R (Eppendorf). Pelet komórkowy płukano następnie trzykrotnie dodając po 4 ml soli PBS bez Ca^{2+} , Mg^{2+} (HyClone, GE Healthcare Life Sciences) i odwirowując całość z prędkością 400xg, przez 10 min., w temp. pokojowej przy użyciu wirówki Eppendorf 5810R (Eppendorf). Otrzymany pelet komórkowy zawieszono następnie w 200 μ l roztworu soli PBS (HyClone, GE Healthcare Life Sciences), a następnie dodawano roztwór RNazy (st. końcowe: 100 $\mu\text{g/ml}$, Ambion) i całość inkubowano przez 5 min., w temp. pokojowej, celem strawienia obecnego w próbce RNA. Do próbki dodawano następnie 1 ml PI (st. końcowe: 50 $\mu\text{g/ml}$, Sigma-Aldrich) i całość inkubowano przez 30 min. w temp. w 37°C . Po skończonej inkubacji, komórki płukano dodając do próbki 4 ml roztworu soli PBS (HyClone, GE Healthcare Life Sciences), a następnie całość wirowano z prędkością 400xg, przez 10 min, w temp. pokojowej przy użyciu wirówki Eppendorf 5810R (Eppendorf). Komórki zawieszano w 500 μ l soli PBS bez Ca^{2+} , Mg^{2+} (HyClone, GE Healthcare Life Sciences) i filtrowano do nowej probówki celem usunięcia agregatów komórkowych (filtr $\varnothing$ 40 μm , BD Falcon). Próbkę analizowano na cytometrze przepływowym BD LSR Fortessa (Becton Dickinson) przy przepływie nie przekraczającym 400 obiektów/s.

3.2.4. Badanie potencjału różnicowania komórek MSCs *in vitro*

W celu potwierdzenia charakteru multipotencjalnego komórek MSCs, komórki te poddawano hodowlom różnicującym w kierunku linii komórek mezodermalnych, przy użyciu komercyjnie dostępnych pożywek różnicujących, zgodnie z zaleceniami producenta, a następnie identyfikowano zróżnicowane komórki określonego fenotypu z zastosowaniem metod histochemicznych.

Hodowle różnicujące komórek MSCs

Komórki MSCs zebrane na pasażu 4-6, wysiewano na płytkę 6-dołkową (Eppendorf) w następujący sposób:

W przypadku różnicowania w kierunku adipocytów: 10^4 komórek/ cm^2 w pożywce DMEM/F12 + 10% FBS (Sigma-Aldrich) na 1 dołek,

W przypadku różnicowania osteogennego: 5×10^3 komórek/ cm^2 w pożywce DMEM/F12 + 10% FBS (Sigma-Aldrich) na 1 dołek;

W przypadku różnicowania chondrogennego: komórki zawieszano w pożywce DMEM/F12 + 10% FBS (Sigma-Aldrich) tak, aby 8×10^4 komórek znajdowało się w objętości 5 μ l zawiesiny. Następnie na każdy dołek nakrapiano 3-4 pojedyncze krople o objętości 5 μ l każda, które następnie inkubowano przez 1h (celem utworzenia agregatów komórkowych) przed dodaniem 2 ml pożywki hodowlanej DMEM/F12 + 10% FBS (Sigma-Aldrich) do całości dołka;

Wysiane komórki MSCs hodowano następnie przez 24h w standardowych warunkach hodowlanych (w temp. 37°C w atmosferze zawierającej 21% O₂ i 5% CO₂ w inkubatorze CO₂ przeznaczonym do hodowli komórek eukariotycznych; Memmert, Indiamart), a następnie usuwano standardową pożywkę hodowlaną. Komórki następnie przepłukiwano jednokrotnie 1 ml soli PBS z jonami Ca²⁺, Mg²⁺ (HyClone, GE Healthcare Life Sciences) i umieszczano w 2 ml specjalistycznych pożywek różnicujących:

W przypadku różnicowania w kierunku adipocytów: Pożywka *StemXVivo Human/Mouse Osteogenic/Adipogenic Base Medium* (R&D Systems) suplementowa *StemXVivo Adipogenic Supplement* (R&D Systems) – pożywka stymulująca powstanie kropli tłuszczu w komórkach świadczących o przebiegu procesu różnicowania.

W przypadku różnicowania osteogennego: Pożywka *StemXVivo Human/Mouse Osteogenic/Adipogenic Base Media* (R&D Systems) suplementowana *StemXVivo Mouse Osteogenic Supplement* (R&D Systems) – pożywka stymulująca mineralizację pojawiającą się podczas różnicowania osteogennego komórek.

W przypadku różnicowania chondrogennego: Pożywka *StemXVivo Human/Mouse Chondrogenic Base Media* (R&D Systems) suplementowane *StemXVivo Human/Mouse Chondrogenic Supplement* (R&D Systems) – pożywka stymulująca wytwarzanie glikozaminoglikanów świadczących o różnicowaniu chondrogennym.

Hodowle różnicujące w w/w pożywkach stymulujących różnicowanie w poszczególne linie mezodermalne, prowadzono przez 11 dni w przypadku różnicowania w kierunku adipocytów oraz 15 dni w przypadku różnicowania w kierunku chondrocytów i osteoblastów, w inkubatorze CO₂ (Mettler, Indiamart), w temp. 37°C, w atmosferze zawierającej 21% O₂ i 5% CO₂.

Barwienie histochemiczne zróżnicowanych komórek MSCs

Po zakończonym różnicowaniu usuwano pożywkę różnicującą i komórki przepłukiwano 1 ml roztworu soli PBS z jonami Ca²⁺, Mg²⁺ (HyClone, GE Healthcare Life Sciences), a następnie utrwalano 4% roztworem paraformaldehydu (przygotowanym w roztworze PBS bez jonów Ca²⁺, Mg²⁺, HyClone, GE Healthcare Life Sciences) (POCh) przez 15 min. w temp. pokojowej. Następnie komórki wybarwiano odpowiednio:

W przypadku różnicowania w kierunku adipocytów: ze względu na krople tłuszczu widoczne w polu mikroskopowym, nie wykonywano barwienia histochemicznego komórek różnicowanych w tym kierunku.

W przypadku różnicowania osteogennego: barwiono czerwienią alizarynową (EMD Millipore) o stężeniu 2% przez 3 min., w temp. pokojowej. Po zakończonym barwieniu, komórki przepłukiwano wodą destylowaną. Wykonane barwienie umożliwiło detekcję mineralizacji świadczącej o różnicowaniu osteogennym.

W przypadku różnicowania chondrogenego: barwiono błękitem alcjańskim (EMD Millipore) o stężeniu 1% przez 30 min., w temp. pokojowej. Po zakończonym barwieniu, komórki przepłukano roztworem 0.1N HCl (POCH), a następnie wodą destylowaną. Zastosowane barwienie umożliwiło wybarwienie powstałej chrząstki na kolor niebieski.

Po zakończonych barwieniach wykonywano zdjęcia komórek przy użyciu mikroskopu Olympus IX81 (Olympus) wyposażonego w kolorową kamerę MicroPublisher 3.3 RTV, celem udokumentowania potencjału multipotencjalnego komórek MSCs.

3.2.5. Izolacja EVs z komórek MSCs

3.2.5.1. Kolekcjonowanie pożywek kondycjonowanych z hodowli komórek MSCs

Komórki MSCs będące na pasażu 4-6 hodowli, przepłukiwano dwukrotnie roztworem soli PBS bez Ca^{2+} , Mg^{2+} w momencie osiągnięcia przez nie 80% - 90% konfluencji, a następnie inkubowano w pożywce DMEM/F12 zawierającej 0,5% surowiczą albuminę wołową (ang. *bovine serum albumin*, BSA; Miltenyi Biotec) przez 24h w celu zebrania pożywek kondycjonowanych niezawierających surowicy mogącej być również źródłem egzogennej EVs.

Pożywkę kondycjonowaną zbierano do 50 ml probówek typu Falcon (BD Falcon), a następnie - w celu usunięcia martwych komórek oraz większych szczątków komórkowych, zebrane pożywki wirowano z prędkością 350xg, przez 10 minut w temp. 4°C, wykorzystując wirówkę Eppendorf 5810R (Eppendorf). Następnie nadsączy przenoszono do nowych próbek kolekcyjnych w/w formatu i umieszczano w temp. -80°C. Pożywki kondycjonowane przechowywano w temp. -80°C do momentu izolacji EVs.

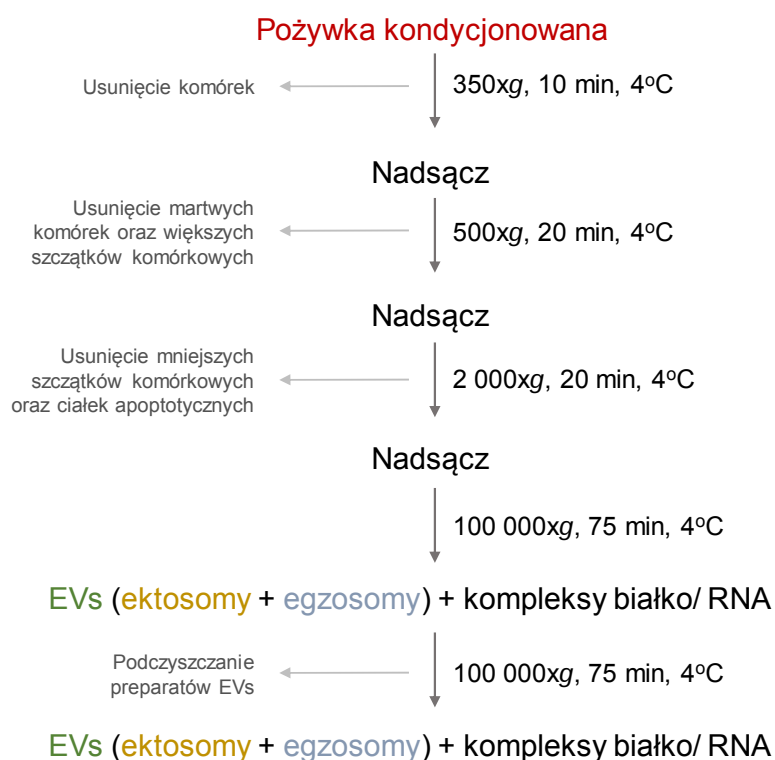
3.2.5.2. Izolacja EVs z pożywek kondycjonowanych metodą sekwencyjnego wirowania

Pożywki kondycjonowane rozmrażano w temp. 37°C i odwirowywano z prędkością 500xg, przez 20 min., w temp. 4°C w celu usunięcia pozostałych martwych komórek i większych szczątków komórkowych. Po przeniesieniu nadsączy do nowych próbek kolekcyjnych (50 ml; BD Falcon), próbki następnie wirowano z prędkością 2000xg, przez 20 min., w temp. 4°C, w celu usunięcia mniejszych szczątków komórkowych oraz ciałek apoptotycznych. Uzyskane supernatanty przenoszono następnie do polipropylenowych probówek dedykowanych do ultrawierowania (28 ml; PP Oak Ridge Tube, ThermoFisher Scientific) i poddawano ultrawierowaniu z prędkością 100 000xg, przez 75 min., w temp. 4°C przy użyciu ultrawirówki Optima XPN (Beckman Coulter) oraz rotora stałokątowego typu T-865 (Thermo Fisher Scientific).

Uzyskane pelety zawierające MSC-EVs następnie rozpipetowywano w 1 ml ultraczystego roztworu soli PBS (bez jonów Ca^{2+} , Mg^{2+} ; Lonza), przenoszono do nowej probówki zbiorczej dedykowanej do ultrawierowania (28 ml; PP Oak Ridge Tube, ThermoFisher Scientific) po czym ponownie ultrawierowano z prędkością 100 000xg, przez 75 min., w temp. 4°C. Schemat kolejnych kroków sekwencji wirowań zastosowanych do izolacji EVs przedstawiono na Rycinie 7.

Pelet MSC-EVs - uzyskany w każdej probówce na etapie drugiego ultrawierowania, zawieszano następnie w 300 μl ultraczystego roztworu PBS (bez jonów Ca^{2+} , Mg^{2+} ; Lonza), porcjowano na mniejsze objętości i umieszczano w probówkach o objętości 1,5 ml typu *LoBind Protein Tubes* (Eppendorf). Tak uzyskane, wysokoskoncentrowane preparaty MSC-EVs przechowywano w temp. -80°C i rozmrażano maksymalnie dwukrotnie w celu prowadzenia dalszych analiz. Stężenie EVs w preparatach oznaczano bezpośrednio przed użyciem w eksperymentach - metodą pośrednią z zastosowaniem metody Bradforda opartej o pomiar ilości białka obecnego w próbce (*procedura opisana poniżej*).

W Tabeli 7 przedstawiono przykładowe wyniki przedstawiające efektywność izolacji MSC-EVs - w oparciu o ilość białka wyizolowanego z pożywki kondycjonowanej zabezpieczonej znad komórek MSCs, w przeliczeniu na liczbę komórek zebranych z powierzchni 75cm² w chwili zebrania pożywki kondycjonowanej.



Rycina 7. Schemat przedstawiający kolejne etapy oczyszczania MSC-EVs z pożywek kondycjonowanych zebranych z hodowli komórek MSCs.

Tabela 7. Efektywność izolacji MSC-EVs z pożywek kondycjonowanych zebranych z hodowli komórek MSCs. Wartości przedstawiają: Średnie $\pm$ SD. N=3.

Liczba komórek zebranych z powierzchni hodowlanej 75 cm ²	Objętość pożywki kondycjonowanej zebranej z powierzchni hodowlanej 75 cm ²	Ilość białka w preparacie MSC-EVs uzyskana z objętości pożywki kondycjonowanej zebranej z 75 cm ²
(2,50 $\pm$ 0,76) x 10 ⁶	12,33 $\pm$ 0,25 ml	11,53 $\pm$ 1,22 ug

3.2.6. Pomiar stężenia białka metodą Bradforda

Stężenie białka w próbkach MSC-EVs, lizatach komórkowych oraz tkankowych (stosowanych w różnych etapach pracy) oznaczano kolorymetryczną metodą Bradforda (200). Przygotowanie lizatów komórek do pomiaru stężenia białka zostało opisane w podrozdziale 3.2.9., natomiast przygotowanie lizatów tkanek w podrozdziale 3.3.2.4.2. W przypadku izolatów MSC-EVs - stężenie białka oznaczano bez wykonania uprzedniego etapu lizy.

W celu wykonania krzywej standardowej, przygotowano roztwory standardu białkowego (BSA; Sigma-Aldrich) o następujących stężeniach: 0,0; 0,031; 0,062; 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 mg/ml, a następnie do każdej próbki standardu dodawano błękit Coomassie (odczynnik Bradforda, Sigma-Aldrich). Równolegle przygotowano roztwory badanych próbek (izolatów MSC-EVs lub lizatów komórkowych lub tkankowych) poprzez dodanie do rozcieńczonej próbki 1 ml odczynnika Bradforda. Wszystkie próbki inkubowano przez 10 min., w temp. pokojowej, bez dostępu światła, a następnie nakładano po 200 μ l/dołek do płytki 96-dołkowej (Corning), w triplicacie.

Pomiar absorbancji wykonano przy długości fali $\lambda=595$ nm za pomocą spektrofotometru MultiskanTM FC (Thermo Scientific) w przypadku analizy próbek MSC-EVs oraz lizatów komórek MSCs lub spektrofotometru Mithras LB 940 Multimode Microplate Reader (Berthold Technologies Bioanalytic) w przypadku analizy lizatów tkanek. Stężenie białka związanego z MSC-EVs oraz w lizatach komórek i tkanek oznaczono w odniesieniu do krzywych wzorcowych standardu BSA.

3.2.7. Ocena integralności ultrastruktury MSC-EVs

W celu zbadania morfologii i integralności ultrastruktury MSC-EVs, wykonywano analizy obrazowe EVs zgodnie z zaleceniami ISEV (167), wykorzystując mikroskopię sił atomowych (ang. *atomic force microscopy*, AFM).

W tym celu, kroplę zawiesiny MSC-EVs (zawierającą 5-10 ug MSC-EVs w przeliczeniu na białko) umieszczano na atomowo równej powierzchni miki i inkubowano przez 20 min., w temp. pokojowej. Następnie powierzchnię płukano delikatnie roztworem ultraczystej soli PBS (bez jonów Ca²⁺, Mg²⁺; Lonza). Pomiar wykonano od razu w kropli roztworu PBS. Topografię powierzchni obrazowano techniką *PeakForce Tapping*, umożliwiającą bezpośrednie monitorowanie siły oddziaływania pomiędzy sondą i

powierzchnią próbki. Technika *PeakForce Tapping* znacząco zmniejsza tę siłę, a tym samym powierzchnię oddziaływania pomiędzy sondą a próbką, co poprawia rozdzielczość skanowania w płaszczyźnie XY oraz umożliwia skuteczne i bezpieczne skanowanie próbek delikatnych, takich jak EVs (201).

Analizy przeprowadzono we współpracy z dr Michałem Sarną z Zakładu Biofizyki, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, zgodnie z protokołami opracowanymi we współpracy z tym laboratorium w celu analiz morfologicznych EVs (114,145).

3.2.8. Analiza wielkości MSC-EVs

Rozkład wielkości cząstek w izolatach MSC-EVs mierzono wykorzystując unikalną technikę TPRS (ang. *Tunable Resistive Pulse Sensing*), która umożliwia wysokoprzepustowe pomiary pojedynczych cząstek przy użyciu systemu IZON qNano (Izon Science Ltd.) wykorzystującego nanopory. W celu kalibracji urządzenia, wykorzystywano kulki kalibracyjne CPC200 Beads (Izon Science) zgodnie z instrukcją producenta.

Próbki MSC-EVs rozcieńczano 20X w ultraczystym roztworze soli PBS (bez jonów Ca^{2+} , Mg^{2+} ; Lonza), a następnie w celu usunięcia dużych agregatów filtrowano przez filtry strzykawkowe *Acrodisc Minispike* Ø 0.45 µm (Sigma-Aldrich). Dodatkowo, w celu wykluczenia zanieczyszczenia nanocząstkami pochodzącymi z nośnika- soli PBS, każdorazowo sprawdzano zawartość cząstek w tym roztworze.

Próbki MSC-EVs analizowano używając nanopora NP200 (analizowany zakres wielkości cząstek: 100-400 nm) stosując w czasie pomiaru ciśnienie 10 oraz 20 mbar. Dla każdej wartości stosowanego ciśnienia, próbki analizowano przez 5 minut lub do momentu zebrania 1000 obiektów. Otrzymane wyniki analizowano przy użyciu oprogramowania Izon Control Suite Software v2.2 (Izon Science).

3.2.9. Analiza wybranych markerów białkowych w preparatach MSC-EVs

W celu oceny występowania markerów charakteryzujących EVs w preparatach MSC-EVs stosowano metodę Western blot - zoptymalizowaną pod kątem analizy EVs.

W tym celu, do próbek MSC-EVs (oraz dla kontroli również komórek MSCs) o obj. 77,5 µl zawierających 60 µg białka zlizowanych uprzednio przy użyciu zimnego buforu lizującego (1x Cell Lysis Buffer, Cell Signalling) zawierającego mieszaninę inhibitorów proteaz (Halt Protease Inhibitor Cocktail, 100X, Thermo Scientific) w stosunku ilościowym 1 µl inhibitorów proteaz/ 100 µl buforu lizującego, dodawano 22,5 µl buforu *Laemmli* (Bio-Rad). Próbki denaturowano w temp. 70°C przez 10 min. Tak przygotowane próbki nakładano następnie do studzienek żelu poliakrylamidowego 4-15% *Mini-PROTEAN TGX Stain-Free* (Bio-Rad) w objętości 22,2 µl/ dołek (co odpowiada 20 µg białka/ dołek), a następnie prowadzono rozdział elektroforetyczny białek w warunkach redukujących (SDS-PAGE), w buforze TSG (Bio-Rad), przez 35 min. przy stałym napięciu 200 V. Rozdzielone na żelu białka przenoszono następnie na membranę nitrocelulozową

poprzez transfer przy użyciu aparatu Transblot Turbo (Bio-Rad), przy następujących warunkach transferu: 1,3 A, 25 V, 7 min.

Następnie, po przepłukaniu membrany buforem TBS-T [ang. *Tris-Buffered Saline with Tween*; skład: 1,72 g NaCl (Sigma-Aldrich); 0,1 g Tween 20 (Sigma-Aldrich); 1,576 Trizma hydrochloride (Sigma-Aldrich) na 190 ml H₂O], prowadzono godziną inkubację w 1% roztworze BSA (Sigma-Aldrich) rozpuszczonego w buforze TBS-T (pH 7,6) - celem zablokowania niespecyficznych miejsc wiązania dla przeciwciał stosowanych w dalszych etapach.

Membrany inkubowano następnie z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym rozcieńczonym w buforze TBS-T przez 30 min., w temp. pokojowej (*stosowane przeciwciała umieszczono w Tabeli 8*), a następnie kontynuowano inkubację w 4°C przez noc. Membrany płukano następnie trzykrotnie roztworem TBS-T, po czym inkubowano przez 1h z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonym z peroksydazą chrzanową (ang. *horseradish peroxidase*, HRP), rozcieńczonymi odpowiednio w buforze TBS-T.

Membrany płukano trzykrotnie TBS-T i inkubowano z chemiluminescencyjnym substratem dla HRP- Luminata Crescendo Western HRP Substrate (EMD Millipore), a następnie wizualizowano przy użyciu systemu Gel Doc (Bio-Rad).

Tabela 8. Lista przeciwciał użytych do analizy Western blot.

	Przeciwciało przeciwko antygenowi:	Rozcieńczenie	Pochodzenie	Producent	Masa molekularna białka [kDa]
Przeciwciało I-rzędowe	β-aktyna	1:2000	mysie	ThermoFisher Scientific	42
	CD9	1:1000	królicze	AntibodyGenie	24
	Kalneksyna	1:500	kozie	ThermoFisher Scientific	100
	Syntenina	1:1000	królicze	ThermoFisher Scientific	30
Przeciwciało II-rzędowe	Przeciwciała mysie (HRP Anty-mysie)	1:4000	kozie	ThermoFisher Scientific	-
	Przeciwciała królicze (HRP Anty-królicze)	1:4000	kozie	Dako	-
	Przeciwciała kozie (HRP Anty-kozie)	1:4000	królicze	ThermoFisher Scientific	-

3.2.10. Globalna analiza proteomiczna MSC-EVs

Celem poszerzonej oceny składu białkowego MSC-EVs oraz celem porównania zawartości białek pomiędzy EVs oraz komórkami MSCs, wykonano globalną analizę proteomiczną z zastosowaniem spektrometrii masowej.

Liza próbek biologicznych do analizy porównawczej proteomu

Komórki MSCs płukano dwukrotnie roztworem PBS bez jonów Ca^{2+} , Mg^{2+} (HyClone, GE Healthcare Life Sciences), a następnie spasażowano zgodnie z procedurą opisaną w pkt. 3.1.3.1. Po odwirowaniu komórek po pasażu, komórki te przepłukiwano roztworem soli PBS bez jonów Ca^{2+} , Mg^{2+} (HyClone, GE Healthcare Life Sciences) i odwirowywano z prędkością 350xg, przez 6 minut w temp. pokojowej przy użyciu wirówki Eppendorf 5810R (Eppendorf). Płukanie komórek MSCs wykonywano dwukrotnie. Pelety komórek MSCs, jak również MSC-EVs wyizolowane z pożywek kondycjonowanych znad mysich komórek MSCs rozpuszczano w buforze lizującym zawierającym 4% SDS (Fluka Chemie), 0,1 M Tris (Roche), 0,1 M ditiotretitol (ang. *dithiothreitol*, DTT; Sigma-Aldrich) o pH 7,6. Materiał biologiczny w buforze lizującym dwukrotnie zhomogenizowano stosując sonikację w trybie impulsowym - 2 razy po 5 min. przy ustawieniu mocy 320 W (intensywność „High”, interwał czasowy 30 s /30 s ON/OFF przy użyciu sonikatora Bioruptor UCD-200, Diagenode). Następnie próbki inkubowano w 95°C przez 5 min. i wirowano z prędkością 16000xg, 15 min., 20°C. Nadsącze przeniesiono do nowych probówek, a następnie przechowywano w temp. -80°C do dalszej analizy.

Trawienie próbek do analizy LC-MS/MS

Próbki biologiczne przygotowywano do analizy proteomicznej metodą chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (ang. *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS), stosując procedurę trawienia białek wspomaganą filtracją - metoda FASP (ang. *Filter-aided sample preparation*) (202). W tym celu, do mieszaniny zawierającej 100 µg białka dodawano 300 µl 8 M roztworu mocznika (POCH) w 50 mM wodorowęglanie amonu (ang. *ammonium bicarbonate*, ABC; POCH), a następnie dodawano DTT (st. końcowe: 50 mM; Sigma-Aldrich), po czym wytrząsano przez 15 min. Próbki odwirowano z prędkością 21 000xg, 15 min., 20°C, a następnie nałożono na kolumnienki VIVACON 500 (Sartorius Stedim Biotech GmbH) z wartością odcięcia równą 30 kDa w celu zagęszczenia próbek. Kolejne etapy – alkilację, płukanie roztworem mocznika oraz płukanie roztworem ABC – wykonano zgodnie z instrukcją dołączoną do FASP™ Protein Digestion Kit (Expendeon) z modyfikacją polegającą na przygotowaniu roztworu 8 M mocznika (POCH) w 50 mM roztworze ABC (POCH). Po cyklu płukań, na każdą kolumnienkę nakładano 1 µg proteazy LysC rozpuszczonej w 75 µl 50 mM roztworu ABC (POCH). Trawienie prowadzono w 37°C przez noc. Po zakończonym trawieniu, próbki odwirowano z prędkością 14000xg, 15 min, 20°C, a następnie nadsącze zawierające peptydy przeniesiono do nowych probówek kolekcyjnych. Peptydy przepłukiwano dwukrotnie 40 µl 50 mM roztworu ABC (parametry wirowania: 14000xg, 15 min, 20°C). Następnie na każdą kolumnienkę dodano po 1 µg trypsyny

zawieszanej w 75 µl 50 mM roztworu ABC (POCH). Trawienie prowadzono w 37°C przez noc. Próbkę odwirowano z prędkością 14000xg, 15 min, 20°C, a następnie nadsącze zawierające peptydy płukano dwukrotnie 40 µl 50 mM roztworu ABC (POCH) i odwirowano z prędkością 14000xg, 15 min, 20°C. Dla każdej badanej próbki przygotowano dwa roztwory peptydów: i) peptydy po trawieniu protezą LysC; ii) peptydy po trawieniu trypsyną.

Frakcjonowanie próbek

Otrzymane mieszaniny peptydów frakcjonowano na złożu z anionitem zgodnie z protokołem przedstawionym przez Wiśniewski i wsp., 2013 (203). W skrócie, peptydy po trawieniu LysC były rozdzielane na cztery frakcje z użyciem buforu uniwersalnego Britton & Robinson (ang. *Britton and Robinson universal buffer*, BRUB) o pH równym odpowiednio 11, 6, 4 i 2. Natomiast peptydy po trawieniu trypsyną rozdzielane były na dwie frakcje z użyciem buforu BRUB o pH 5 i 2. Otrzymane frakcje oczyszczono na złożu C18 w układzie „Stage-Tips” (204) według następującego protokołu: aktywacja złoża metanolem (POCH); płukanie 60% acetonitrylem (ang. *acetonitrile*, ACN; POCH) z 1% kwasem octowym (POCH); równoważenie złoża 1% kwasem octowym; nałożenie próbki; płukanie 1% kwasem octowym; elucja 60% ACN z 1% kwasem octowym. Próbkę po elucji suszono w wyparce próżniowej i rozpuszczono w 2% ACN/0,05% kwasie trifluoroctowym (ang. *trifluoroacetic acid*, TFA; POCH) w celu dalszej analizy.

Analiza LC-MS/MS

Próbki komórek MSCs oraz MSC-EVs analizowano przy użyciu wysokorozdzielczego spektrometru masowego Q Exactive (ThermoFisher Scientific) sprzężonego z nanoHPLC (UltiMate 3000 RSLCnano System, ThermoFisher Scientific). Peptydy ładowano na prekolumnę ze złożem C18 o długości 2 cm (wielkość ziaren 3 µm, rozmiar porów 100 Å, ID 75 µm, AcclaimPepMap100 C18, Thermo Scientific) w 2% ACN z 0,05% TFA (POCH), a następnie rozdzielano na kolumnie ze złożem C18 o długości 50 cm (wielkość ziaren 2 µm, rozmiar porów 100 Å, AcclaimPepMapRSLC C18, ThermoFisher Scientific; ID 75 µm) w ciągu 4h w gradiencie ACN od 2% do 40% z dodatkiem 0,05% kwasu mrówkowego (POCH). Do pomiaru MS użyto metody Top 12 z rozdzielczością 70 000 dla skanu MS i 17 500 dla pomiaru MS/MS.

Analiza danych MS

Uzyskane dane analizowano przy użyciu programu Proteome Discoverer 1.4. Serwer Mascot (v2.5.1, Matrix Science), który wykorzystywano do przeszukania bazy danych SwissProt_2015_09 zawężonej do taksonomii *Mus musculus*. Parametry przeszukania były następujące: enzym – trypsyna; liczba opuszczonych miejsc cięcia – 2; modyfikacje stałe – karbamidometylacja; modyfikacje zmienne – oksydacja (M); tolerancja masy dla prekursora – 10 ppm; tolerancja masy dla fragmentów – 20 mmu. Dane zebrane dla sześciu frakcji danej próbki były analizowane w jednym przeszukaniu. Walidację wyników przeszukania wykonywano w programie Proteome Discoverer z użyciem algorytmu Percolator (205). Współczynnik FDR (ang. *False discovery rate*) dla uzyskanych wyników wynosił poniżej 1%.

Analiza danych proteomicznych z komórek MSCs oraz MSC-EVs

Analizę porównawczą proteomów komórek MSCs oraz MSC-EVs wykonano przy użyciu terminów Ontologii Genów (ang. *Gene Ontology*, GO), wykorzystując oprogramowanie FatiGO (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>). Analizę przeprowadzono przy poziomie GO równym 3-9, a za wartość graniczną poziomu istotności przyjęto $P = 0,05$.

Dodatkowo, w celu określenia występowania w próbkach EVs białek charakterystycznych dla egzosomów, listę białek zidentyfikowanych w MSC-EVs analizowano pod kątem występowania 100 białek często identyfikowanych w egzosomach zgodnie z danymi opublikowanymi na stronie ExoCarta (<http://www.exocarta.org/>). Listę białek zidentyfikowanych w preparatach MSC-EVs analizowano także pod kątem ich przynależności do określonych ścieżek sygnałowych na podstawie adnotacji GO: Panther Pathways (<http://www.geneontology.org/>) przyjmując FDR poniżej 1%. W dalszym etapie dla białek zidentyfikowanych w próbkach MSC-EVs zaangażowanych w wybrane procesy biologiczne przeprowadzono analizę oddziaływań pomiędzy nimi przy użyciu komercyjnie dostępnej aplikacji STRING Ver. 10.5 (<https://string-db.org/>).

Globalną analizę proteomiczną MSC-EVs oraz komórek MSCs wykonano we współpracy z Panią dr hab. Sylwią Kędracką-Krok z Zakładu Biochemii Fizycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie oraz Pracowni Proteomiki i Spektrometrii Mas Ośrodka Biologii Strukturalnej Małopolskiego Centrum Biotechnologii w Krakowie.

3.2.11. Analiza składu mikroRNA w MSC-EVs

W celu określenia bioaktywnej zawartości przenoszonej przez MSC-EVs w postaci cząsteczek miRNA, a także porównania jej z miRNA występującymi w komórkach MSCs, wykonano poszerzoną analizę transkryptomiczną MSC-EVs oraz komórek MSCs z zastosowaniem ilościowej reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym.

Izolacja RNA

Całkowite RNA wzbogacone w miRNA izolowano z badanych próbek przy użyciu zestawu *miRCURY™ RNA Isolation kit* (Exiqon) zgodnie z instrukcją dołączoną przez producenta z niewielkimi modyfikacjami. W skrócie, do zawiesiny MSC-EVs lub peletu komórek MSCs dodawano 350 μ l roztworu lizującego (*Lysis Solution*, Exiqon) zawierającego β -merkaptotanol (st. końcowe: 1%, *Bond-Breaker TCEP Solution*; Thermo Scientific), a następnie mieszano próbki przez 15 sekund przy użyciu vortexu. Do roztworów dodawano po 200 μ l 99,8% etanolu (POCH) i mieszano przez 10 sekund przy użyciu vortexu. Całość mieszanin przenoszono na osobne kolumny *Mini Spin Column* (Exiqon) umieszczone w probówkach kolekcyjnych (Exiqon), po czym wirowano próbki z prędkością 3500xg, przez 1 min., w temp. pokojowej przy użyciu wirówki Eppendorf 5418 R (Eppendorf) w celu związania RNA do powierzchni membran. Następnie, usunięto przesącz, po czym każdą kolumnę płukano przy użyciu 400 μ l roztworu *Wash Solution* (Exiqon), a następnie wirowano z prędkością 14 000xg, przez 2 min., w temp. pokojowej

przy użyciu wirówki Eppendorf 5418 R (Eppendorf). Usunięto przesącz, po czym na kolumny nakładano po 100 µl roztworu *Turbo DNase* [przygotowanego wcześniej poprzez zmieszanie 90 µl wody wolnej od RNaz (Eurx), 10 µl 10x *Turbo DNase Buffer* (Ambion) oraz 0,5 µl *Turbo DNase* 2U/µl (Ambion)/ 1 próbkę], po czym wirowano kolumny z prędkością 200xg, przez 2 min., w temp. pokojowej przy użyciu wirówki Eppendorf 5418 R (Eppendorf). Kolumny inkubowano przez 10 min., w temp. pokojowej. Następnie dwukrotnie płukano każdą kolumnę przy użyciu 400 µl roztworu *Wash Solution* (Exiqon), po czym wirowano z prędkością 14 000xg, przez 2 min., w temp. pokojowej przy użyciu wirówki Eppendorf 5418 R (Eppendorf) i usuwano przesącze. W celu całkowitego podsuszenia kolumn, umieszczano je w nowych probówkach kolekcyjnych (Exiqon), po czym wirowano z prędkością 14 000xg, przez 2 min., w temp. pokojowej przy użyciu wirówki Eppendorf 5418 R (Eppendorf). Kolumny przeniesiono do indywidualnych probówek kolekcyjnych o objętości 1,5 ml typu Eppendorf (Exiqon), po czym delikatnie nałożono na każdą membranę kolumny po 30 µl buforu do elucji (*Elution Buffer*, Exiqon) i inkubowano przez 1 min. Kolumny wirowano z prędkością 200xg, przez 2 min., w temp. pokojowej, a następnie ponownie wirowano - z prędkością 14 000xg, przez 1 min., w temp. pokojowej przy użyciu wirówki Eppendorf 5418 R (Eppendorf). RNA przechowywano na lodzie do czasu pomiaru jego stężenia.

Czystość i stężenie wyizolowanego RNA oznaczano przy użyciu spektrofotometru Nano Photometer (Implen). Do dalszych analiz wykorzystywano wyłącznie RNA, dla którego stężenie wynosiło >5 ng/µl, natomiast stosunek absorbancji $A_{260/280}$, świadczący o czystości wyizolowanego RNA, mieścił się w zakresie 1.75 - 2.00 (dla czystego RNA wartość wynosi ~2.0) (206).

Odwrotna transkrypcja

Wyizolowane RNA przepisywano na cDNA stosując zestaw *miRCURY LNA™ Universal RT microRNA Kit* (Exiqon) zgodnie z instrukcją dołączoną przez producenta zestawu. Przygotowywano mieszaninę reakcyjną, której skład przedstawiono w Tabeli 9. Mieszaninę umieszczoną w probówkach do odwrotnej transkrypcji o obj. 0,2 ml (ThermoFisher Scientific) umieszczano w termocyklerze C1000 Touch (Bio-Rad), a następnie prowadzono reakcję zgodnie z schematem zawartym w Tabeli 10. Po skończonej reakcji uzyskane cDNA przechowywano w temp. -25°C.

Tabela 9. Skład mieszaniny do odwrotnej transkrypcji. Objętości podane zostały w przeliczeniu na 1 badaną próbkę.

Skład mieszaniny do odwrotnej transkrypcji	
Odczynnik	Objętość
Bufor reakcyjny, 5x stężony	8,0 µl
Woda wolna od RNaz	18,0 µl
Mieszanina enzymów	4,0 µl
<i>Synthetic RNA spike'ins</i>	2,0 µl

RNA (o stężeniu 5 ng/ µl)	8,0 µl
Całkowita objętość	40,0 µl

Tabela 10. Warunki termiczne przebiegu reakcji RT-PCR w celu analizy występowania wybranych miRNA w badanych próbkach.

Warunki przebiegu reakcji odwrotnej transkrypcji		
	Temperatura	Czas
Odwrotna transkrypcja	42°C	60 min.
Inaktywacja enzymu	95°C	5 min.
Chłodzenie	4°C	□

Reakcja PCR w czasie rzeczywistym

Uzyskane cDNA wykorzystano jako matryce w reakcji PCR w czasie rzeczywistym w celu detekcji miRNA występujących w MSC-EVs oraz komórkach MSCs.

Przygotowano mieszaninę do reakcji PCR w czasie rzeczywistym zawierającą: 4000 µl *Power SYBR Green PCR Master Mix* (ThermoFisher Scientific), 4000 µl wody wolnej od RNaz (Eurx) oraz 40 µl cDNA. Całość wymieszano, a następnie przy użyciu pipety *Multipette E3* (Eppendorf) precyzyjnie dozowano po 10 µl mieszaniny reakcyjnej do każdego dołka płytki 384-dołkowej. Do badania występowania miRNA w MSC-EVs wykorzystano gotowe, komercyjnie dostępne płytki 384 - dołkowe zawierające mysie primery dla badanych miRNA - *Mouse & Rat Panel I+II, V3.M* (Exiqon).

Płytki zamknięto przy użyciu dedykowanej folii typu *MicroAmp Optical Adhesive Film* (ThermoFisher Scientific), a następnie odwirowano z prędkością 2000xg, przez 2 min., w temp. pokojowej przy użyciu wirówki Eppendorf 5810R (Eppendorf). Reakcja PCR w czasie rzeczywistym prowadzona była w aparacie *QS6 Real-Time PCR System* (ThermoFisher Scientific). Program przebiegu reakcji przedstawiono w Tabeli 11. Uzyskane wyniki poddano analizie przy użyciu oprogramowania GenEx (Exiqon) przy użyciu kalibratorów *RNA Spike-ins* (Exiqon).

Tabela 11. Profil termiczny przebiegu reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

PCR w czasie rzeczywistym			
Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Aktywacja polimerazy DNA	95°C	10 min.	1 cykl
Denaturacja	95°C	10 sek.	40 cykli
Hybrydyzacja/elongacja	60°C	1 min.	

3.2.12. Analiza obecności transkryptów mRNA w MSC-EVs

W celu określenia występowania wybranych transkryptów mRNA w preparatach MSC-EVs w odniesieniu do komórek MSCs, wykonano izolację RNA z obu typów próbek, odwrotną transkrypcję, a następnie reakcję PCR w czasie rzeczywistym.

Izolacja RNA oraz przepisanie RNA na cDNA

Całkowite RNA izolowano zestawem RNeasy Mini Kit (Qiagen), zgodnie z instrukcją dołączoną przez producenta. Po pomiarze stężenia wyizolowanego RNA (*opisanego w podrozdziale 3.2.11.*), prowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji w celu uzyskania komplementarnego DNA (cDNA) stosując odczynniki wchodzące w skład zestawu *TaqMan Reverse Transcription Reagents* (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific) zgodnie z zaleceniami producenta. Mieszaninę reakcyjną przygotowywano według informacji podanych w Tabeli 12, a następnie przeprowadzano reakcję odwrotnej transkrypcji stosując odpowiednie warunki termiczne wymienione w Tabeli 13 przy użyciu termocyklera C1000 Touch (Bio-Rad). Po skończonej reakcji, cDNA przechowywano w temp. -25°C.

Tabela 12. Skład mieszaniny do odwrotnej transkrypcji. Objętości podane zostały w przeliczeniu na 1 analizowaną próbkę.

Skład mieszaniny do RT-PCR	
Odczynnik	Objętość
Bufor reakcyjny, 10x stężony (10x RT Buffer)	4,0 µl
Roztwór MgCl ₂ (MgCl ₂ Solution, 25 mM)	8,8 µl
Mieszanina deoksynukleotydów (dNTP Mixture, 2.5mM each dNTP)	8,0 µl
Losowe heksamery (Random Hexamers, 50 µM)	1,0 µl
Oligomery tymidylanu (Oligo dT(16), 50 µM)	1,0 µl
Inhibitor RNaz (20 U/µl)	0,8 µl
Odwrotna transkryptaza 50 U/µL	1,0 µl
RNA	Max. 15,4 µl
Woda wolna od RNaz	15,4 µl - objętość próbki RNA
Całkowita objętość	40,0 µl

Tabela 13. Warunki termiczne przebiegu reakcji RT-PCR w celu analizy występowania wybranych miRNA w badanych próbkach.

Etap	Temperatura	Czas
Inkubacja	25°C	10 min.
Odwrotna transkrypcja	48°C	30 min.
Inaktywacja enzymu	95°C	5 min.
Chłodzenie	4°C	□

Reakcja PCR w czasie rzeczywistym

W kolejnym kroku prowadzono reakcję PCR w czasie rzeczywistym wykorzystując komercyjnie dostępny odczynnik *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific). W Tabeli 14 zamieszczono skład mieszaniny reakcyjnej, natomiast w Tabeli 15 przedstawiono profil termiczny przebiegu reakcji. Specyficzne pary starterów dla poszczególnych genów wykorzystywane w reakcji PCR w czasie rzeczywistym, zostały zaprojektowane przez nasz zespół i zamówione w firmie Genomed (Polska) - sekwencje przedstawiono w Tabeli 16. Reakcję PCR w czasie rzeczywistym prowadzono w termocyklerze 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific). Każdorazowo generowano krzywe topnienia (ang. *melting curves*) w celu odróżnienia specyficznych od niespecyficznych produktów reakcji.

W niniejszej pracy doktorskiej przedstawiono wyłącznie wyniki ekspresji genów, dla których uzyskano specyficzne produkty reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Tabela 14. Skład mieszaniny do PCR w czasie rzeczywistym. Objętości podane zostały w przeliczeniu na 1 analizowaną próbkę.

Skład mieszaniny do PCR w czasie rzeczywistym	
Odczynnik	Objętość
Starter <i>forward</i>	1,5 µl
Starter <i>reverse</i>	1,5 µl
SYBR Green PCR Master Mix, 2x	12,5 µl
RNA	2,0 µl
Woda wolna od RNaz	7,5 µl
Całkowita objętość	25,0 µl

Tabela 15. Profil termiczny przebiegu reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

PCR w czasie rzeczywistym			
Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Aktywacja polimerazy DNA	95°C	10 min.	1 cykl
PCR	Denaturacja	95°C	15 sekund
	Hybrydyzacja/elongacja	60°C	1 min.
			40 cykli

Tabela 16. Sekwencje starterów użytych w reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

PCR w czasie rzeczywistym		
Gen		Sekwencja 5'-3'
B2- mikroglobulina	F	CATACGCCTGCAGAGTTAAGCA
	R	GATCACATGTCTCGATCCCAGTAG
Mesp-1	F	CAGTCGCAGTCGCTCGGT
	R	GCGTACAGGAACGATGGGT
Bcl-2	F	CTTTGAGTTCGGTGGGGTCA
	R	GTTCCACAAAGGCATCCCAG
Bak-1	F	CATCTTGGGTCAGGTGGGTC
	R	TGGA ACTCTGTGTCGTAGCG
Bax-1	F	GATCCAAGACCAGGGTGGC
	R	CTTCCAGATGGTGAGCGAGG
VE-kadheryna	F	TTCAAGCTGCCAGAAAACCA
	R	GAGCCTTGTCAGGGTCTTTGG
Gata-2	F	TGCACAATGTTAACAGGCCAC
	R	CCTCGAAACATTCAGCCCCT
Gata-4	F	TCCAGTGCTGTCTGCTCTAAGC
	R	TGGCCTGCGATGTCTGAGT

3.2.13. Analiza profilu antygenów powierzchniowych MSC-EVs

Celem oceny obecności wybranych antygenów na powierzchni MSC-EVs, w tym m.in. markerów charakterystycznych dla komórek MSCs, preparaty EVs poddawano analizie przy użyciu wysokorozdzielczego cytometru przepływowego Apogee A50-Micro (Apogee Flow Systems) - dedykowanego do analizy cytometrycznej nanocząstek, a następnie analizie w cytometrii obrazowej.

Podczas wykonywania analizy, próbki dodatkowo barwiono wykorzystując barwnik fluorescencyjny *SYTO RNA Select green fluorescent cell stain* (ThermoFisher Scientific), wiążący się do RNA w celu analizy obecności wybranych antygenów na powierzchni integralnych nanocząstek.

Bezpośrednio przed rozpoczęciem analizy cytofluorymetrycznej, do próbek o obj. 1,5 ml typu *LoBind Protein Tubes* (Eppendorf) dodawano po 350 µl ultraczystego roztworu PBS (bez jonów Ca^{2+} , Mg^{2+} ; Lonza), a następnie po 0,35 µl barwnika fluorescencyjnego *SYTO RNA Select green fluorescent cell stain* (ThermoFisher Scientific). Następnie, do każdej z przygotowanych próbek dodawano po 5 µl jednego z pośród wymienionych przeciwciał: anti- CD29, CD44, CD81, CD90, Sca-1 lub odpowiednich kontroli izotypowych (Tabela 17). Probówki wirowano z prędkością 16000xg, przez 20 min., w temp. 4°C w celu osadzenia agregatów barwnika RNA oraz agregatów przeciwciał. Następnie, do nowych próbek o objętości 1,5 ml typu *LoBind Protein Tubes* (Eppendorf) dodawano po 250 µl odwirowanej mieszaniny ultraczystego roztworu PBS (bez jonów Ca^{2+} , Mg^{2+} ; Lonza) zawierającego 0,71 µg danego przeciwciała oraz *SYTO RNA Select green fluorescent cell stain* (st. końcowe: 5 nM; ThermoFisher

Scientific). Na końcu do każdej próbki dodawano po 2 µg EVs. Preparaty MSC-EVs barwiono przez 30 min., na lodzie, bez dostępu światła. Po skończonym barwieniu, próbki natychmiast analizowano na cytometrze Apogee A50-Micro (Apogee Flow Systems). Przed rozpoczęciem właściwej analizy cytometrycznej, cytometr Apogee A50-Micro kalibrowano wykorzystując zestaw *ApogeeMix* (Apogee Flow Systems) zawierający mieszaninę silikonowych kulek o określonych średnicach wielkości wynoszących: 180 nm, 240 nm, 300 nm, 590 nm, 880 nm, 1300 nm oraz kulek polistyrenowych o następujących średnicach wielkości: 110 nm i 500 nm, umożliwiającą także analizę dystrybucji wielkościowej subpopulacji analizowanych EVs.

Tabela 17. Lista przeciwciał wykorzystanych do analiz cytometrycznych MSC-EVs.

	Przeciwciało przeciwko antygenowi	Fluorochrom	Klon	Izotyp	Producent
Badane antygeny	CD29	APC	HMβ1-1	Armenian Hamster IgG	Biolegend
	CD44	APC	IM7	Rat IgG2b, κ	Biolegend
	CD81	APC	Eat2	Armenian Hamster IgG	BD Biosciences
	CD90	APC	30-H12	Rat IgG2b, κ	Biolegend
	CD309 (VEGFR2)	APC	Avas12	Rat IgG2a, κ	Biolegend
	Sca-1	APC	E13-161.7	Rat IgG2a, κ	Biolegend
Kontrole izotypowe	-	APC	HTK888	Armenian Hamster IgG	Biolegend
	-	APC	RTK2758	Rat IgG2a, K	Biolegend
	-	APC	RTK4530	Rat IgG2b, K	Biolegend

W celu wykluczenia z analizy EVs wybarwionych niespecyficznie, podczas analizy od procentu nanocząstek pozytywnych pod kątem ekspresji określonego antygeny, odejmowano wartość procentową otrzymaną dla odpowiadającej kontroli izotypowej.

W celu potwierdzenia wyników otrzymanych za pomocą wysokorozdzielczego cytometru Apogee A50-Micro, w analizie obrazowej - wybrane próbki wybarwione zgodnie z wyżej opisanym protokołem, analizowano następnie przy użyciu cytometru obrazowego ImageStream X Mark II (Merck).

3.2.14. Ocena internalizacji MSC-EVs przez komórki MCEC *in vitro*

W celu oceny internalizacji - określanej także jako wychwyt EVs - przez komórki docelowe w warunkach *in vitro*, wykorzystany został model, w którym komórki śródbłonna naczyń serca (MCEC) inkubowano z MSC-EVs zgodnie z protokołem opublikowanym w *Nature Communications* przez Mantel i wsp. z niewielkimi modyfikacjami (207). W zaprojektowanym układzie eksperymentalnym, komórki umieszczano w warunkach imitujących mikrośrodowisko uszkodzonego mięśnia

sercowego, tj. w hipoksji oraz w obecności cytokin prozapalnych - IL-1 β (ang. *interleukin-1 β*) oraz TNF- α (ang. *tumor necrosis factor- α*).

W tym celu, komórki MCEC wysiewano na szalki typu Willco (5 x 10⁴ komórek/szalkę) Ø 35 mm, ze szklanym dnem (WillCo Wells B.V.), opłaszczone wcześniej żelatyną (st. końcowe: 0,1%; Sigma-Aldrich). Po 24h od wysiania, szalki z komórkami podzielono na następujące grupy eksperymentalne:

1) kontrola - dalsza hodowla w pożywce DMEM + 5% FBS (Sigma-Aldrich); w warunkach normoksji (21% O₂) w inkubatorze CO₂ (Mettler, Indiamart), w temp. 37°C, w atmosferze zawierającej 21% O₂ i 5% CO₂.

2) mikrośrodowisko stanu zapalnego i hipoksji - dalsza hodowla w pożywce DMEM + 1% FBS (Sigma-Aldrich) zawierająca cytokiny prozapalne: IL-1 β (st. końcowe: 10 ng/ml; Peprotech) oraz TNF- α (st. końcowe: 10 ng/ml; ThermoFisher Scientific); w warunkach hipoksji (2% O₂) w inkubatorze CO₂/O₂ (Panasonic, Sanyo Electric Co., Ltd.), w temp. 37°C, w atmosferze zawierającej 2% O₂ i 5% CO₂.

Po 24h od stymulacji, do komórek obu grup dodawano po 50 μ g MSC-EVs wybarwionych fluorescencyjnie zgodnie z protokołem opisanym poniżej.

Po 2, 4 oraz 24 godzinach od dodania MSC-EVs, komórki fotografowano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Leica DMI6000B ver. AF7000, wyposażonego w oprogramowanie Leica Application Suite X (Leica Microsystems) w celu późniejszego pomiaru średniej intensywności fluorescencji komórek MCEC. Średnią intensywność fluorescencji komórek mierzono za pomocą programu ImageJ.

Barwienie MSC-EVs w celu ich wykorzystania do oceny internalizacji

180 μ l preparatu MSC-EVs zawierającego 100 μ g białka umieszczano w probówce o objętości 1,5 ml typu *LoBind Protein Tubes* (Eppendorf). Następnie do próbki dodawano 1 μ l lipofilnego barwnika *Vybrant DiO Cell-Labeling Solution* (stosunek ilościowy: 1:180, ThermoFisher Scientific), który znakuje błony komórkowe oraz dodatkowo barwnik *SYTO RNA Select green fluorescent cell stain* (st. końcowe: 9 μ M; ThermoFisher Scientific) wiążący się do RNA wewnątrz pęcherzyków. MSC-EVs barwiono przez 20 min., w temp. pokojowej, bez dostępu światła. Po zakończonym barwieniu, MSC-EVs dodawano bezpośrednio do pożywek hodowlanych.

3.2.15. Ocena wpływu MSC-EVs na potencjał angiogeny komórek MCEC *in vitro*

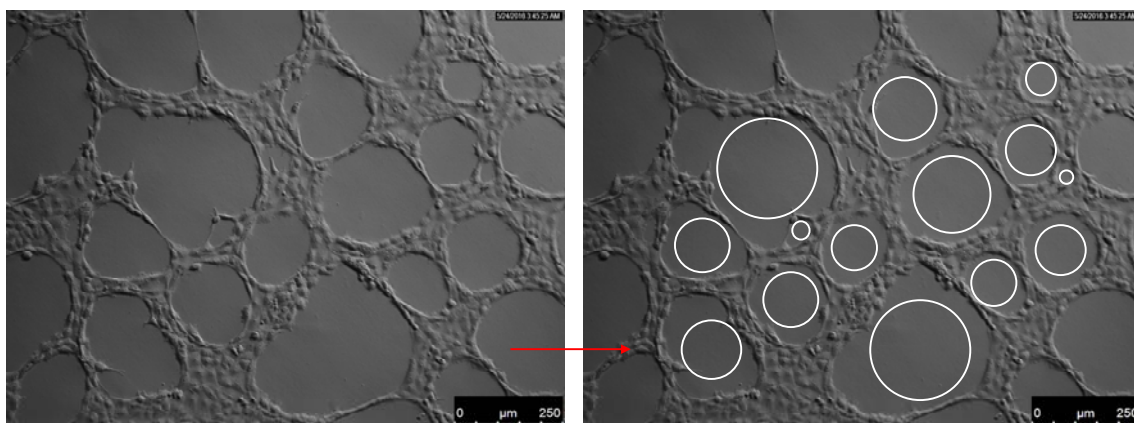
W celu oceny wpływu MSC-EVs na potencjał angiogeny komórek śródbłona naczyń serca *in vitro*, wykonano test oceniający efektywność tworzenia kapilar na matryzeli (208) przez komórki MCEC inkubowane w obecności MSC-EVs.

W tym celu, schłodzoną płytkę 24-dółkową pokrywano półpłynnym podłożem typu *Matrigel Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced* (Corning) w ilości 100 μ l/ dołek, a następnie umieszczono w inkubatorze CO₂ (Mettler, Indiamart), w

temp. 37°C, w atmosferze zawierającej 21% O₂ i 5% CO₂ na 30 minut. Na pokryte matryzelem dołki wysiewano następnie komórki MCEC w liczbie 5 x 10⁴ komórek/ dołek, w kompletnej pożywce EGM-2MV (Lonza) dedykowanej hodowli komórek śródbłónka mikrowaskularnego, a następnie podzielono dołki na następujące grupy doświadczalne:

- 1) mikrośrodowisko kontrolne - dalsza inkubacja w pożywce EGM-2MV (Lonza)
- 2) mikrośrodowisko stanu zapalnego - do pożywki EGM-2MV dodawano IL-1β (st. końcowe: 10 ng/ml, Peprotech) oraz TNFα (st. końcowe: 10 ng/ml, Peprotech)
- 3) mikrośrodowisko kontrolne + MSC-EVs - do pożywki EGM-2MV dodawano MSC-EVs (st. końcowe: 10 µg/ml)
- 4) mikrośrodowisko stanu zapalnego + MSC-EVs - do pożywki EGM-2MV dodawano IL-1β (st. końcowe: 10 ng/ml, Peprotech) oraz TNFα (st. końcowe: 10 ng/ml, Peprotech) oraz MSC-EVs (st. końcowe: 10 µg/ml).

Płytki hodowlane umieszczano w komorze inkubacyjnej zapewniającej standardowe warunki hodowlane - tj. 5% CO₂, 37°C (PeCon GmbH) połączonej z mikroskopem Leica DMI6000B (Leica Microsystems). Proces tworzenia kapilar przez komórki MCEC rejestrowano przy użyciu akwizycji obrazu w trybie *time-lapse* przez 8h z krokiem czasowym równym 1h. Średnią liczbę kapilar na pole mikroskopowe wyliczano na podstawie analizy przynajmniej 10 zdjęć mikroskopowych wykonanych dla danego punktu czasowego, w których liczono pełne struktury kapilarne utworzone przez komórki MCEC (zgodnie z podejściem przedstawionym na Rycinie 8). Z analizy wykluczano kapilary, których fragment znajdował się poza kadrem obrazu.



Rycina 8. Metoda ilościowej oceny liczby kapilar utworzonych przez komórki w teście angiogennym na matryzeli in vitro. Przykładowa analiza zdjęcia mikroskopowego komórek MCEC wysianych na matryzeli, w wyniku której zidentyfikowano 14 zamkniętych kapilar zaznaczonych białymi kółkami. Z analizy wyluczono kapilary, których fragment znajdował się poza kadrem obrazu. Skala: 250 µm. Materiały własne.

3.2.16. Analiza ekspresji markerów aktywowanego śródbłonka naczyniowego na powierzchni komórek MCEC *in vitro*

W celu analizy zmian ekspresji wybranych markerów charakterystycznych dla komórek aktywowanego śródbłonka naczyniowego w modelu *in vitro*, komórki MCEC wysiewano na szalki hodowlane (Ø 60 mm; BD Falcon) opłaskzczone żelatyną (st. końcowe: 0,1%; Sigma-Aldrich) w liczbie 10^5 komórek/ szalkę w pożywce DMEM + 5% FBS (Sigma-Aldrich), a następnie umieszczano w inkubatorze CO₂ (Memmert, Indiamart), w temp. 37°C, w atmosferze zawierającej 21% O₂ i 5% CO₂. Po 24h, wszystkie przygotowane szalki podzielono na następujące grupy doświadczalne:

- 1) mikrośrodowisko kontrolne – dalsza hodowla w pożywce DMEM + 5% FBS (Sigma-Aldrich), hodowla w warunkach normoksji (21% O₂) w inkubatorze CO₂ (Memmert, Indiamart), w temp. 37°C, w atmosferze zawierającej 21% O₂ i 5% CO₂
- 2) mikrośrodowisko stanu zapalnego i hipoksji – do pożywki DMEM + 1% FBS (Sigma-Aldrich) dodawano IL-1β (st. końcowe: 10 ng/ml, Peprotech) oraz TNFα (st. końcowe: 10 ng/ml, Peprotech), a następnie prowadzono hodowlę w inkubatorze CO₂/O₂ (Panasonic, Sanyo Electric Co., Ltd.), w temp. 37°C, w atmosferze zawierającej 2% O₂ i 5% CO₂.

Po 24h od stymulacji cytokinami prozapalnymi oraz hipoksją, do połowy płytek z warunków mikrośrodowiska stanu zapalnego i hipoksji, dodawano MSC-EVs (st. końcowe: 10 µg/ml) w związku z czym otrzymano następujące grupy doświadczalne:

- 1) mikrośrodowisko kontrolne – dalsza hodowla w pożywce DMEM + 5% FBS (Sigma-Aldrich), hodowla w warunkach normoksji (21% O₂) w inkubatorze CO₂ (Memmert, Indiamart), w temp. 37°C, w atmosferze zawierającej 21% O₂ i 5% CO₂
- 2) mikrośrodowisko stanu zapalnego i hipoksji – dalsza hodowla w pożywce DMEM + 1% FBS (Sigma-Aldrich) do której dodawano IL-1β (st. końcowe: 10 ng/ml, Peprotech) oraz TNFα (st. końcowe: 10 ng/ml, Peprotech), a następnie prowadzono hodowlę w inkubatorze CO₂/O₂ (Panasonic, Sanyo Electric Co., Ltd.), w temp. 37°C, w atmosferze zawierającej 2% O₂ i 5% CO₂
- 3) mikrośrodowisko stanu zapalnego i hipoksji + MSC-EVs – do pożywki DMEM + 1% FBS (Sigma-Aldrich) dodawano IL-1β (st. końcowe: 10 ng/ml, Peprotech), TNFα (st. końcowe: 10 ng/ml, Peprotech) oraz MSC-EVs (st. końcowe: 10 µg/ml), a następnie prowadzono hodowlę w inkubatorze CO₂/O₂ (Panasonic, Sanyo Electric Co., Ltd.), w temp. 37°C, w atmosferze zawierającej 2% O₂ i 5% CO₂.

Po 4 oraz 24h od dodania MSC-EVs, usuwano pożywki hodowlane, komórki delikatnie przepłukiwano roztworem PBS bez jonów Ca²⁺, Mg²⁺ (HyClone, GE Healthcare Life Sciences), a następnie komórki pasażowano przy użyciu TrypLE Select Enzyme 1X (zgodnie z protokołem opisanym w podrozdziale 3.1.2.2.).

Pelety komórek MCEC z każdej z czterech grup zawieszano w pożywce DMEM suplementowanej 1% FBS (Sigma-Aldrich), rozdzielano do próbówek cytometrycznych (5ml; BD Falcon), a następnie barwiono przeciwciałami skierowanymi przeciwko następującym antygenom charakterystycznym dla aktywowanego śródbłónka naczyniowego: CD54, CD62E, CD62P, CD106 oraz dwóm wybranym antygenom nie związanym z procesem stanu zapalnego, takich jak: CD90 oraz Sca-1 (Tabela 6) zgodnie z instrukcją dołączoną przez producenta przez 30 min., na lodzie, bez dostępu światła.

Po barwieniu komórki płukano objętością 3 ml roztworu soli PBS bez Ca^{2+} , Mg^{2+} (HyClone, GE Healthcare Life Sciences) i odwirowywano z prędkością 300xg, przez 6 min., w temp. pokojowej przy użyciu wirówki Eppendorf 5810R (Eppendorf). Komórki zawieszano w pożywce DMEM suplementowanej 1% FBS (Sigma-Aldrich). Bezpośrednio przed analizą, do zawiesiny komórek dodawano roztwór barwnika jądrowego DAPI (st. końcowe: 3 μM ; ThermoFisher Scientific) w celu późniejszego wykluczenia z analizy komórek martwych. Wybarwione komórki analizowano w kierunku antygenów występujących na powierzchni komórek MCEC przy użyciu cytometru przepływowego BD LSR Fortessa (BD Bioscience). Barwienie barwnikiem DAPI pozwoliło dodatkowo określić żywotność komórek MCEC w w/w warunkach eksperymentalnych.

3.3. Modele i procedury badań *in vivo*

3.3.1. Badania *in vivo* z wykorzystaniem mysiego modelu ostrego zawału mięśnia sercowego

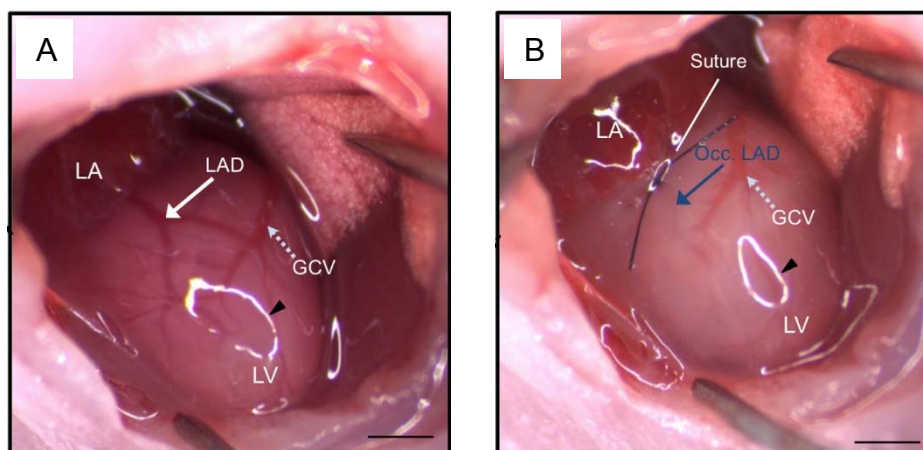
Opis modelu

Badania z wykorzystaniem mysiego modelu uszkodzenia serca, wykonane zostały częściowo przez doktorantkę w ramach stażu (zrealizowanego w ramach grantu ETIUDA finansowanego przez NCN) - we współpracy z grupą Prof. Buddhadeb Dawn'a w *Cardiovascular Research Institute, Division of Cardiovascular Diseases, University of Kansas Medical Center, Kansas City, USA*, która posiada unikatowe doświadczenie w przeprowadzaniu zawału mięśnia sercowego (ang. *acute myocardial infarction*, AMI) u małych zwierząt - w modelu uszkodzenia ischemiczno-reperfuzyjnego (I/R).

Do doświadczeń wykorzystano myszy szczepu dzikiego C57Bl/6J (Charles River) w wieku 12-14 tygodni o masie ciała 22-29 g, które po anestezji wziewnej z zastosowaniem anestetyka AErrane (Baxter) poddawano zabiegowi prowadzącemu do ostrego zawału mięśnia sercowego.

W skrócie, po wprowadzeniu myszy w anestezję przystąpiono do ich intubacji, a następnie wentylacji płuc przy użyciu MiniVent Ventilator for Mice (Model 845; Harvard Apparatus). W kolejnym kroku, zwierzętom otwierano klatkę piersiową w celu zablokowania przepływu krwi w tętnicy przedniej zstępującej (ang. *left anterior descending artery*, LAD) poprzez zawiązanie pętli nici chirurgicznej (o grubości 8-0, Medtronic), która powodowała ucisk na naczynie, a tym samym zablokowanie przepływu krwi. Na Rycinie 9 przedstawiono schemat blokowania przepływu krwi w tętnicy LAD. Po 30 min. pętlę przecinano, w celu przywrócenia przepływu krwi, prowadzącego jednocześnie do reperfuzji i dodatkowego uszkodzenia z tym związanego. Zabieg

zakończono założeniem szwów i zamknięciem klatki piersiowej. Myszy po zabiegu umieszczano w regałach pooperacyjnych w celu rekonwalescencji.



Rycina 9. Schemat wykonania zabiegu podwiązania tętnicy przedniej zstępującej (LAD) w mysim modelu niedokrwienego uszkodzenia tkankowego AMI. Na schemacie zaznaczono następujące struktury anatomiczne: lewy przedsionek (LA), lewą komorę (LV), żyłę wieńcową wielką (GCV), a także założony szew (Suture) oraz podwiązaną tętnicę przednią zstępującą (Occ. LAD). **A.** Przed założeniem szwu, **B.** Po założeniu szwu. Źródło zdjęć: (209), zmodyfikowano.

Powyższy model uszkodzenia mięśnia sercowego *in vivo* wykorzystywano w dalszych badaniach, w celu oceny retencji przeszczepionych MSC-EVs oraz ich potencjału regeneracyjnego. Badania te były w części wykonane przez doktorantkę na miejscu, w czasie jej stażu w *Cardiovascular Research Institute, Division of Cardiovascular Diseases, University of Kansas Medical Center, Kansas City* w USA.

3.3.1.1. Badanie retencji MSC-EVs w narządach po uszkodzeniu AMI

W celu określenia retencji MSC-EVs po ich podaniu dożylnym w modelu uszkodzenia tkankowego AMI, wybarwione fluorescencyjnie MSC-EVs lokalizowano w wybranych tkankach z zastosowaniem obrazowania całych organów oraz metod mikroskopowych.

W tym celu, na wstępnym etapie wykonano szereg doświadczeń optymalizacyjnych, które umożliwiły dobranie odpowiedniego barwnika fluorescencyjnego (spośród następujących: *Vybrant DiO Cell-Labeling Solution*, *Vybrant DiI Cell-Labeling Solution* DiI, DiR, DiI_{C18}(7) - 1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-etramethylindotricarbocyanine Iodide); ThermoFisher Scientific) oraz aparatury do detekcji (spośród następującej: IVIS Spectrum In Vivo Imaging System, Perkin Elmer oraz In Vivo Optical Imaging System, Bruker), umożliwiającej pomiar sygnału fluorescencyjnego w celu identyfikacji przeszczepionych MSC-EVs w warunkach *in vivo*.

W niniejszej pracy nie przedstawiono sekwencji metod i wyników, które doprowadziły do wyboru optymalnego barwnika fluorescencyjnego - DiR oraz systemu do detekcji - IVIS Spectrum In Vivo Imaging System.

W celu wykonania badania, myszy poddawano zabiegowi uszkodzenia tkankowego AMI lub operacji pozorowanej (ang. *sham surgery*, Sham), podczas której po otwarciu klatki piersiowej, na tętnicy LAD zakładano luźny szew, którym nie powodował zablokowania przepływu krwi w tej tętnicy, której celem było określenie czy sama procedura otwarcia klatki piersiowej nie powoduje powstania sygnału tła. Następnie zwierzęta podzielono na następujące grupy doświadczalne zgodnie z opisem umieszczonym w Tabeli 18.

Tabela 18. Grupy doświadczalne myszy w badaniu retencji MSC-EVs w wybranych narządach po uszkodzeniu tkankowym AMI.

Grupa	Zabieg		Czas od zabiegu po którym podawano MSC-EVs/ PBS	Podanie		Czas od podania po którym pobierano narządy
	Sham	AMI		PBS	MSC-EVs	
1 RT (Kontrola)	-	-	-	-	-	-
2 RT (Kontrola)	X		48h	X		4h
3 RT (Kontrola)		X	48h	X		4h
4 RT (Kontrola)	X		48h		X	4h
5 RT		X	48h		X	30 min.
6 RT		X	48h		X	4h
7 RT		X	48h		X	24h
8 RT		X	30 min.		X	4h

Po 30 min. lub 48h od zabiegu (AMI lub Sham) myszom podawano do żyły szyjnej po 50 μ l roztworu soli PBS (bez jonów Ca^{2+} , Mg^{2+} ; Lonza), który wykorzystywano wcześniej do zawieszania MSC-EVs (kontrola; ang. *vehicle*) lub po 50 μ l wybarwionych fluorescencyjnie preparatów MSC-EVs zawierających 100 μ g białka.

Po 30 min., 4h lub 24h od dożylnego podania MSC-EVs lub PBS, zwierzęta usypiano, a następnie pobierano krew z LK serca przy użyciu strzykawki o objętości 1 ml z igłą (BD Falcon) zawierającej 50 μ l heparyny (st. końcowe: 50 USP units/ml, Sagent Pharmaceuticals). Następnie pobierano organy: wątrobę, śledzionę, serce, płuca, nerki, przewód pokarmowy oraz kończyny dolne, z których następnie izolowano kości. Za pomocą strzykawki o objętości 5 ml (BD) z kaniulą 20G (Vasofix Certo, Braun) zawierającą roztwór soli PBS bez jonów Ca^{2+} , Mg^{2+} (Sigma-Aldrich), z przewodu pokarmowego wypłukiwano treść pokarmową, w celu wyeliminowania sygnału autofluorescencji. Organy umieszczano na lodzie, a następnie po ich schłodzeniu przenoszono je do szalek 12 dołkowych (BD Falcon) zawierających zimny (+4°C) roztwór soli PBS bez jonów Ca^{2+} , Mg^{2+} (Sigma-Aldrich), zabezpieczając płytkę przed dostępem światła.

Barwienie MSC-EVs w celu ich wykorzystania do badania retencji w tkankach

Bezpośrednio przed podaniem, MSC-EVs barwiono lipofilnym barwnikiem fluorescencyjnym DIR; DiIC₁₈(7), który znakuje błony komórkowe (st. końcowe: 10 µM; ThermoFisher Scientific) przez 30 min., w temp. pokojowej, bez dostępu światła. Po wybarwieniu, MSC-EVs przenoszono do strzykawki mikrolitrowej typu Hamilton o objętości 100 µl z igłą 30G (Hamilton).

Podanie MSC-EVs do żyły szyjnej w celu badania ich retencji w tkankach

Po anestezji wziewnej z zastosowaniem anestetyka AErrane (Baxter), za pomocą jałowego skalpela wykonywano ok. 1 cm nacięcie skóry w miejscu przebiegu żyły szyjnej. Do żyły szyjnej bardzo powoli podawano 50 µl roztworu soli PBS (bez jonów Ca²⁺, Mg²⁺; Lonza) lub 50 µl zawiesiny MSC-EVs. Zabieg zakończono założeniem szwów. Myszy po zabiegu umieszczano w regałach pooperacyjnych w celu rekonwalescencji.

Analiza obrazowa

Detekcję fluorescencji w wyizolowanych organach, pochodzącą od nagromadzonych MSC-EVs, przeprowadzano przy użyciu aparatury In Vivo Optical Imaging System (Bruker) udostępnionej przez The University of Kansas w Lawrence, KS, USA.

Analiza mikroskopowa

W celu potwierdzenia wyników uzyskanych za pomocą systemu do obrazowania, metodami histologicznymi, wybrane narządy mrożono w medium mrozeniowym *Tissue Freezing Medium* (Leica Biosystems), a następnie cięto na kriostatcie Leica CM-3050-S (udostępnionym przez Smith IDDRC Histology Equipment, University of Kansas Medical Center). Skrawki tkanek umieszczano na szkiełkach typu *Poly-Prep Slides* (Sigma-Aldrich), a następnie preparaty zamykano bez etapu utrwalania, przy użyciu medium *Vectashield Hard Set Mounting Medium* zawierającego w swoim składzie barwnik DAPI (Vector Laboratories), barwiący jądra komórkowe w preparatach. Preparaty analizowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Leica TCS SPE (Leica Biosystems; udostępnionego przez Confocal Imaging Facility, University of Kansas Medical Center) w kierunku identyfikacji fluorescencji pochodzącej od nagromadzonych MSC-EVs.

3.3.1.2. Badanie potencjału regeneracyjnego MSC-EVs po uszkodzeniu AMI

W celu oceny potencjału regeneracyjnego MSC-EVs oraz porównania go z potencjałem regeneracyjnym obserwowanym po podaniu komórek MSCs, wykorzystano opisany powyżej model uszkodzenia tkankowego AMI. Bezpośrednio przed zabiegiem, myszom wykonano badanie echokardiograficzne, a następnie poddano je zabiegowi AMI zgodnie z opisem przedstawionym w pkt. 3.3.1.

Po 48h od AMI, zwierzęta podzielono na następujące grupy doświadczalne zgodnie z opisem umieszczonym w Tabeli 19.

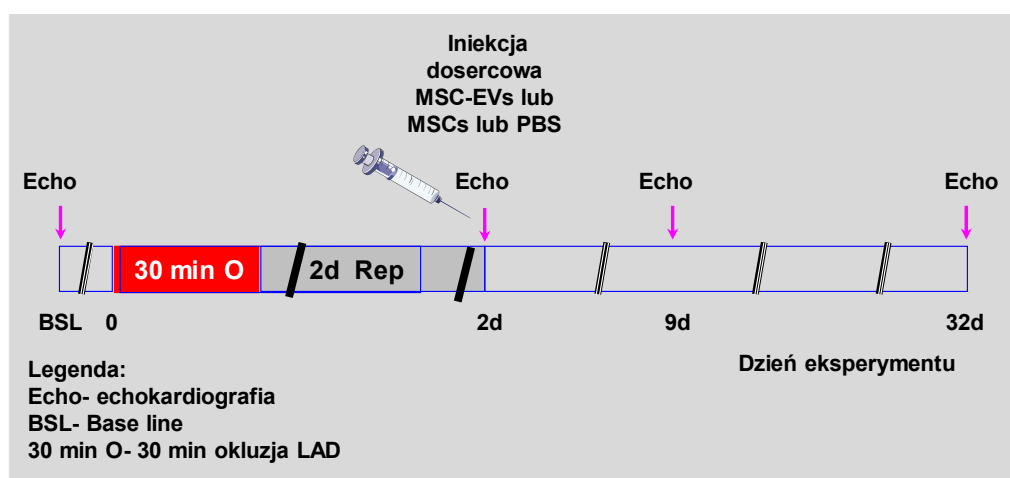
Tabela 19. Grupy doświadczalne myszy w badaniu potencjału regeneracyjnego MSC-EVs oraz komórek MSCs po uszkodzeniu tkankowym AMI. REG- badanie regeneracji.

Grupa	Zabieg		Czas od zabiegu po którym podawano MSC-EVs/ MSCs/ PBS	Podanie		
	Sham	AMI		PBS	MSC-EVs	Komórki MSCs
1 REG (Kontrola)		X	48h	X		
2 REG		X	48h		X	
3 REG		X	48h			X

Podanie MSC-EVs w strefę okołozawałową w mięśniu sercowym

Po anestezji wziewnej z zastosowaniem anestetyka AErrane (Baxter) oraz intubacji zwierząt, myszom ponownie otwierano klatkę piersiową w celu podania w okolicę okołozawałową 30 μ l roztworu soli PBS (bez jonów Ca^{2+} , Mg^{2+} ; Lonza) lub 30 μ l zawiesiny MSC-EVs zawierających 100 μ g białka lub 30 μ l zawiesiny komórek MSCs zawierającej 1×10^6 tych komórek - za pomocą strzykawki mikrolitrowej typu Hamilton o objętości 50 μ l z igłą 30G (Hamilton). Preparaty podawano w okolicę okołozawałową w postaci 5-ciu nakłóc miokardium. Zabieg podania zakończono założeniem szwów i zamknięciem klatki piersiowej. Myszy po zabiegu umieszczano w regałach pooperacyjnych w celu rekonwalescencji.

W przeprowadzonym badaniu podawano myszom komórki MSCs wykazujące endogenną ekspresję znacznika eGFP oraz MSC-EVs wyizolowane z pożywek kondycjonowanych zebranych z hodowli tych komórek. Schemat badania potencjału regeneracyjnego MSC-EVs, oraz komórek rodzicielskich (MSCs) przedstawiono na Rycinie 10.



Rycina 10. Schemat badania potencjału regeneracyjnego MSC-EVs oraz komórek MSCs w mysim modelu ostrego zawału mięśnia sercowego (AMI). Myszom wykonywano badanie echokardiograficzne (Echo, BSL 0), a następnie poddawano zabiegowi uszkodzenia tkankowego

poprzez trwające 30 min. (30 min O) zablokowanie przepływu krwi w tętnicy przedniej zstępującej (LAD). Po 48 godzinnym (48h) okresie reperfuzji (Rep), myszy poddawano badaniu Echo w celu weryfikacji powstania uszkodzenia tkankowego, a następnie zwierzętom ponownie otwierano klatkę piersiową i podawano bezpośrednio do mięśnia sercowego, w okolicę okołozawałową preparaty MSC-EVs lub komórek MSCs lub roztwór soli PBS. Po 9 oraz 32 dniach od zabiegu uszkodzenia tkankowego AMI, myszy poddawano badaniu Echo. Eksperyment zakończono po 32 dniach od AMI (32d).

3.3.1.3. Analiza funkcjonalna serca *in vivo* - Badania echokardiograficzne (ECHO)

Celem oceny funkcji serca *in vivo*, przed zabiegiem AMI (dzień 0), jak również w dniach 2, 4, 9 i 32 od AMI, u myszy wykonywano badanie echokardiograficzne przy użyciu systemu ultrasonograficznego Vevo 2100 (FUJIFILM Visual Sonics).

Wykorzystując głowicę MS400 emitującą ultradźwięki o długości fali 18 - 38 MHz, w trybie B-Mode, wykonywano zdjęcia anatomii serca ustawiając tak głowicę aby uzyskać obraz serca w osi długiej oraz krótkiej, a następnie w trybie M-Mode - pracę (ruch) serca, dzięki czemu uzyskano dane pozwalające ocenić funkcje hemodynamiczne mięśnia sercowego - w szczególności jego lewej komory (LK), a także anatomiczną przebudowę pozawałową (tzw. remodeling serca). Uzyskane dane analizowano następnie ilościowo, indywidualnie dla każdego zwierzęcia, za pomocą oprogramowania VevoStrain (FUJIFILM Visual Sonics).

3.3.1.4. Analiza histologiczna tkanek serca *post mortem* - Barwienie histochemiczne

W celu potwierdzenia wyników uzyskanych za pomocą systemu Vevo 2100, a w szczególności wizualizacji grubości ściany LK w miejscu dotkniętym niedotlenieniem, wykonano barwienia histochemiczne preparatów tkanki mięśnia sercowego.

Pobieranie tkanek

Po 32 dniach od zabiegu AMI, myszy usypiano za pomocą anestezji wziewnej z zastosowaniem AErrane (Baxter), po czym podawano *i.v.* 50 μ l roztworu heparyny (1000 USP units/ ml, Sagen Pharmaceuticals), a następnie po upływie 5 min. 500 μ l 5% roztworu chlorku potasu (Sigma-Aldrich). Zwierzęta perfundowano ustrojowo z zastosowaniem zimnej (+4°C) soli PBS (Sigma-Aldrich) przez 5 min., w celu usunięcia krwi z całości krwioobiegu. W kolejnym etapie pobierano tkanki serca i umieszczano w roztworze formaliny (10 %; Sigma-Aldrich) celem ich utrwalenia na okres 48h. Następnie, tkanki były zatapiane w parafinie w Pracowni Histologicznej na University of Kansas Medical Center. Bloczki parafinowe przechowywano do momentu procesowania w temp. pokojowej.

W celu wykonania dalszych badań histochemicznych i immunohistochemicznych, tkanki skrawano na skrawki grubości 4 μ m z zastosowaniem mikrotomu Leica RM2255

(Leica Biosystems). W niniejszej pracy doktorskiej przedstawiono wyłącznie barwienie metodą Massona wykonywane zgodnie z procedurą opisaną poniżej.

Barwienie metodą Massona

W celu oceny grubości ściany LK serca w miejscu niedotlenienia, wykonano barwienie trójkolorowe metodą Massona. W tym celu, pocięte skrawki tkanek serca umieszczano na szkiełkach mikroskopowych pokrytych poly-L-lizyną (szkiełka typu Poly-Prep Slides, Sigma-Aldrich), a następnie suszono w cieplarni (Binder) w temp. 70°C przez 30 min. Skrawki odparafinowywano poprzez umieszczenie szkiełek na 5 min. w czterech zmianach ksyleny (99% każda; Acros Organics, Fisher Scientific), a następnie uwadniano w szeregu alkoholowym, złożonym z alkoholu etylowego (Acros Organics, Fisher Scientific) o malejących stężeniach, tj.: ok. 100% (3 min.), 100% (3 min.), 96% (3 min.), 96% (3 min.), 90% (3 min.) i 80% (3 min.) oraz końcowo w wodzie destylowanej (3 min.). Następnie szkiełka umieszczano w płynie Bouina (Sigma-Aldrich) podgrzanym do temp. 56°C, celem ich utrwalenia, a także wzmocnienia intensywności barwienia, po czym inkubowano temp. 56°C przez 15 min. w cieplarni (Binder). Preparaty delikatnie płukano wodą kranową (o temp. pokojowej) do momentu usunięcia żółtego zabarwienia, po czym w celu wybarwienia jąder komórkowych barwiono roztworem hematoksyliny *Weigerta* (Sigma-Aldrich) przez 5 min. i ponownie płukano wodą kranową. Kolejno, skrawki barwiono w roztworze *Beibrich Scarlet - Acid Fuschin* (Sigma-Aldrich) przez 5 min., celem wybarwienia włókien mięśniowych, a następnie płukano wodą destylowaną do momentu usunięcia czerwonego zabarwienia. Preparaty umieszczano w roztworze *Phospho- Tungstic- Molybdic* (Sigma-Aldrich) na 5 min. oraz przez kolejne 5 min. barwiono w roztworze błękitu anilinowego (Sigma-Aldrich) celem wybarwienia kolagenu. Szkiełka umieszczano następnie w 1% roztworze kwasu octowego (Sigma-Aldrich) na 2 min. w celu uzyskania delikatniejszego zabarwienia struktur morfologicznych, a następnie odpłukano w wodzie destylowanej.

Po zakończonym barwieniu, prowadzono proces odwadniania preparatów poprzez trzykrotne zanurzenie szkiełek kolejno w następujących roztworach alkoholu etylowego o wzrastających stężeniach: 80%, 90%, 96%, 100%, 100% (Acros Organics, Fisher Scientific) oraz dwóch zmianach ksyleny (99% każda, Acros Organics, Fisher Scientific). Na wybarwione skrawki tkanek nakładano medium do trwałego zamykania preparatów - *Permout Mounting Medium* (Fisher Scientific), przykrywano szkiełkiem nakrywkowym i tak przygotowane preparaty analizowano w mikroskopie Zeiss Axio Scope (Zeiss) wyposażonym w kolorową kamerę AxioCam 512.

3.3.2. Badania *in vivo* z wykorzystaniem mysiego modelu niedokrwiennego uszkodzenia kończyny

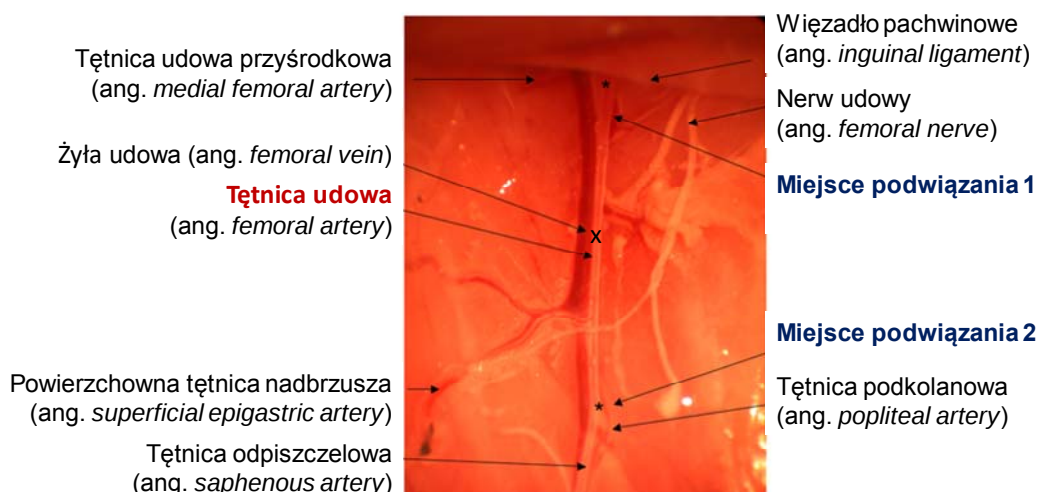
Opis modelu

Badania wykorzystujące mysy model niedokrwiennego uszkodzenia kończyny, wykonane zostały przez doktorantkę w czasie stażu naukowego (zrealizowanego w ramach programu ERASMUS+ Praktyki) - we współpracy z grupą Prof. Ramarosona Andriantsitohaina z *INSERM U1063, Stress Oxydant et Pathologies Métaboliques, Institut de Biologie en Santé, Université d'Angers, Angers we Francji*, która posiada wieloletnie doświadczenie w przeprowadzaniu zabiegu niedokrwiennego uszkodzenia kończyny (ang. *limb ischemia*, LI) u małych zwierząt. Protokół LI wykorzystywany w INSERM jest zgodny z protokołem opracowanym na Stanford University, Stanford, California w USA (210).

Myszy szczepu dzikiego C57Bl/6 (Charles River) w wieku 10-13 tygodni, były usypiane z zastosowaniem anestezji wziewnej za pomocą AErrane (Baxter), a następnie poddawane zabiegowi zablokowania przepływu krwi w tętnicy udowej, prowadzącemu do niedokrwienia i uszkodzenia tkanek kończyny dolnej.

W tym celu, za pomocą jałowego skalpela wykonano ok. 1,5 cm nacięcie skóry lewej kończyny w miejscu przebiegu tętnicy udowej, a następnie za pomocą pincety oraz cienkich nici chirurgicznych (grubość 6-0, Ethicon) podwiązano tętnicę udową w dwóch miejscach: 1) w okolicach pachwiny stawu biodrowego oraz 2) w połowie wysokości uda (zgodnie ze schematem przedstawionym na Rycinie 11). Za pomocą precyzyjnych nożyczek przecięto tętnicę udową pomiędzy dwoma miejscami zablokowania przepływu (w miejscu oznaczonym na Rycinie 11 symbolem *x*), aby całkowicie uniemożliwić przepływ krwi głównym naczyniem. Zabieg zakończono założeniem szwów zamykających ranę oraz oceną skuteczności wykonanej okluzji za pomocą pomiaru perfuzji kończyn metodą Dopplera przy użyciu sytemu *Laser Doppler Perfusion Imager PeriScan PIM 3* (Perimed AB).

Powyższy mysy model niedokrwiennego uszkodzenia kończyny *in vivo* wykorzystywano w dalszych badaniach, w celu oceny retencji przeszczepionych MSC-EVs oraz ich potencjału regeneracyjnego. Badania te zostały wykonane przez doktorantkę na miejscu, w czasie jej stażu w *INSERM U1063, Stress Oxydant et Pathologies Métaboliques, Institut de Biologie en Santé, Université d'Angers, Angers we Francji*.



Rycina 11. Schemat wykonywania zabiegu podwiązania tętnicy udowej w mysim modelu niedokrwiennego uszkodzenia kończyny (LI). Na schemacie zaznaczono najważniejsze struktury anatomiczne sąsiadujące z tętnicą udową. Za pomocą gwiazdek (*) zaznaczono dwa miejsca podwiązania tętnicy udowej, natomiast za pomocą symbolu (x) miejsce przecięcia tętnicy udowej wykonane w celu całkowitego uniemożliwienia przepływu krwi przez tę tętnicę. Przygotowano na podstawie: (210), zmodyfikowano.

3.3.2.1. Badanie retencji MSC-EVs w narządach po niedokrwinnym uszkodzeniu kończyny

Myszy poddawano zabiegowi niedokrwiennego uszkodzenia tkanek LI, a następnie zwierzęta podzielono na następujące grupy doświadczalne zgodnie z opisem umieszczonym w Tabeli 20.

Tabela 20. Grupy doświadczalne myszy w badaniu retencji MSC-EVs w wybranych narządach po uszkodzeniu tkankowym LI.

Grupa	Zabieg LI	Czas od zabiegu po którym podawano MSC-EVs/ PBS	Podanie		Czas od podania po którym pobierano narządy
			PBS	MSC-EVs	
1 RT (Kontrola)	X	24h	X		4h
2 RT	X	24h		X	4h
3 RT	X	24h		X	24h

Po 24h od zabiegu LI, myszom podawano dożylnie (do żyły ogonowej) po 50 μ l roztworu soli PBS (bez jonów Ca^{2+} , Mg^{2+} ; Lonza) lub 50 μ l zawiesiny MSC-EVs zawierającej 100 μ g białka związanego z tymi nanocząstkami. MSCs-EVs wykorzystane w tym modelu wyizolowane zostały z pożywek kondycjonowanych zebranych z hodowli komórek MSCs wykazujących endogenną ekspresję markera eGFP.

Po 4 oraz 24h od podania roztworu soli PBS lub MSC-EVs, myszy poddawano eutanazji z zastosowaniem CO₂, a następnie indywidualnie od każdego zwierzęcia pobierano krew z LK do probówek *BD Vacutainer K2 EDTA* (BD), a także wybrane narządy: wątrobę, nerki, śledzionę, płuca oraz kończyny. Narządy umieszczano w roztworze soli PBS w dołkach płytki 12 dołkowej (BD Falcon) i przechowywano w temp. + 4°C, bez dostępu światła, do czasu analizy.

W celu izolacji osocza, krew odwirowywano z prędkością 350xg, 7 min, w temp. pokojowej, a następnie osocze przenoszono do nowych probówek o obj. 1,5 ml typu Eppendorf (Eppendorf).

Intensywność fluorescencji emitowaną przez osocze, narządy oraz wyizolowane kończyny dolne - świadcząca o stopniu zakumulowania podanych MSC-EVs, mierzono przy użyciu systemu Maestro In-vivo Fluorescence Imaging System (Caliper LifeSciences). Od średnich wartości fluorescencji dla osocza, narządów oraz kończyn uzyskanych dla zwierząt grupy, której podawano MSC-EVs odejmowano średnie wartości fluorescencji uzyskane dla zwierząt grupy kontrolnej (poziom autofluorescencji tkanek), przy użyciu oprogramowania Living Image.

3.3.2.2. Badanie potencjału regeneracyjnego MSC-EVs po niedokrwienym uszkodzeniu kończyny

W celu oceny potencjału regeneracyjnego MSC-EVs podawanych dożylnie, wykorzystano wyżej opisany model niedokrwienego uszkodzenia kończyny LI *in vivo*.

Myszy szczepu dzikiego C57Bl/6 (Charles River) zostały poddane zabiegowi LI zgodnie z opisem w pkt. 3.3.2., a następnie bezpośrednio po zabiegu podzielone na dwie grupy doświadczalne zgodnie z informacjami zawartymi w Tabeli 21.

Tabela 21. Grupy doświadczalne myszy w badaniu potencjału regeneracyjnego MSC-EVs w wybranych narządach po uszkodzeniu tkankowym LI. * MSCs-EVs wyizolowane zostały z pożywek kondycjonowanych zebranych z hodowli komórek MSCs wykazujących ekspresję endogennego znacznika eGFP. REG- badanie regeneracji.

Grupa	Zabieg LI	Czas od zabiegu po którym pierwszy raz podawano MSC-EVs/ PBS	Podanie		Całkowita liczba podań <i>i.v.</i>	Dawka MSC-EVs/ 1 podanie
			PBS	MSC-EVs*		
1 REG (Kontrola)	X	1h	X		7	-
2 REG (EVs)	X	1h		X	7	10 µg/ 1 ml krwi myszy

Ilość podawanych MSC-EVs (w μg białka mierzonego w preparatach MSC-EVs metodą Bradforda opisaną w podrozdziale 3.2.6. *Pomiar stężenia białka metodą Bradforda*) obliczano indywidulanie dla każdej myszy w przeliczeniu na masę ciała i objętość krwi. Sposób wykonywania obliczeń przedstawiono poniżej.

Obliczanie objętości krwi u wybranej myszy

Przykład: Mysz o masie ciała 24,4 g

Założenie*: 8 ml krwi – 100,0 g masy ciała myszy

x ml krwi – 24,4 g masy ciała myszy

Objętość krwi u myszy: 1,95 ml

(*) założenie dokonane na podstawie wskazówek technicznych dotyczących pobierania krwi i obliczania jej objętości u myszy opracowanych przez *J. Hoff* (211).

Obliczanie ilości podawanych MSC-EVs

Dawka: 10 μg MSC-EVs/ 1 ml krwi

1 ml krwi myszy – 10 μg MSC-EVs

1,95 ml krwi – x μg MSC-EVs

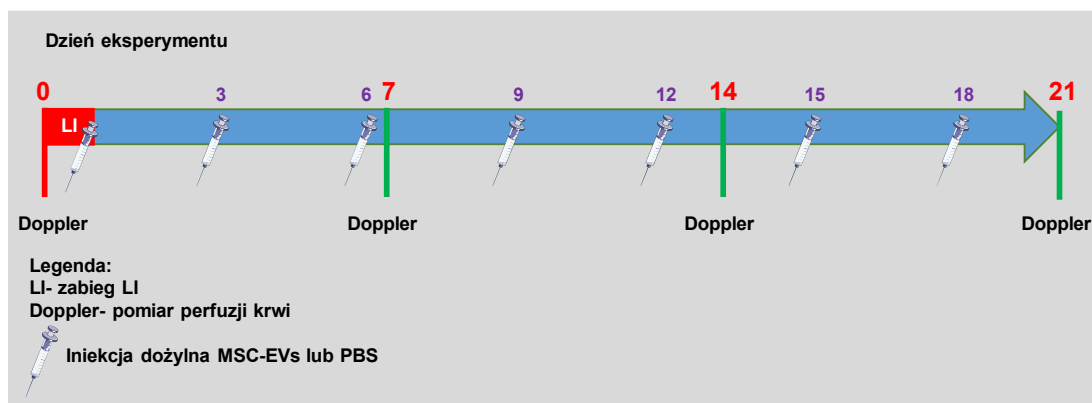
Ilość podawanych MSC-EVs: **19,5 μg MSC-EVs** (na 1 podanie)

W Tabeli 22 zamieszczono wyniki obliczeń ilości podawanych MSC-EVs dla poszczególnych myszy w eksperymencie.

Tabela 22. Obliczenia objętości krwi u poszczególnych myszy oraz ilości podawanych MSC-EVs na podstawie masy ciała zwierząt. Zwierzęta ważono w dniu ich zakwalifikowania do eksperymentu.

ILOŚĆ MSC-EVs PODAWANYCH DOŻYLNIE DLA POSZCZEGÓLNYCH MYSZY									
Nr myszy	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Masa [g]	20,0	22,0	21,4	22,0	22,8	24,4	20,7	23,1	24,8
Objętość krwi [ml]	1,60	1,76	1,71	1,60	1,82	1,95	1,66	1,85	1,98
Ilość podawanych MSC-EVs [μg]/ 1 podanie	16,0	17,6	17,1	16,0	18,2	19,5	16,6	18,5	19,8

Schemat badania potencjału regeneracyjnego MSC-EVs w odniesieniu do myszy kontrolnych w mysim modelu uszkodzenia tkankowego LI *in vivo* przedstawiono na Rycinie 12.



Rycina 12. Schemat badania potencjału regeneracyjnego MSC-EVs w mysim modelu niedokrwiennego uszkodzenia kończyny (LI) *in vivo*. Myszy poddawano zabiegowi niedokrwiennego uszkodzenia kończyny LI (0d). Bezpośrednio przed zabiegiem, jak również bezpośrednio po zabiegu (0d), a także w dniach 7, 14 oraz 21 wykonywano myszom badanie przepływu krwi w kończynach metodą Dopplera. Począwszy od dnia zabiegu (0d), co trzy dni (tj. w dniach 0, 3, 6, 9, 12, 15 i 18) myszom podawano dożylnie po 10 μ g MSC-EVs w przeliczeniu na 1 ml krwi zwierzęcia/ 1 podanie. W dniu 21 zakończono eksperyment i pobierano tkanki do dalszych analiz molekularnych oraz immunohistochemicznych.

3.3.2.3. Analiza funkcjonalna *in vivo* - Badanie przepływu krwi w kończynach metodą Dopplera

W celu oceny perfuzji krwi w tkankach mięśniowych w kończynach dolnych po podaniu MSC-EVs, świadczącej o postępującej regeneracji, w wybranych punktach czasowych myszy poddawano badaniu z zastosowaniem systemu Dopplera.

Przed wykonaniem zabiegu LI, bezpośrednio po zabiegu (dzień 0), jak również w 7, 14 oraz 21 dniu od zabiegu, myszy poddawano badaniu przepływu krwi w kończynach przy użyciu systemu Laser Doppler Perfusion Imager PeriScan PIM 3 (Perimed AB). Po anestezji wziewnej za pomocą AErrane (Baxter), myszy umieszczano na platformach podgrzewanych do temp. 37°C - warunkujących stałą temperaturę ciała zwierzęcia podczas badania przepływu krwi. Za pomocą czujnika stale monitorowano temperaturę ciała zwierząt w trakcie pomiaru perfuzji tkanek.

Wartość przepływu krwi w poszczególnych kończynach analizowano za pomocą oprogramowania LDPIwin (Perimed AB), gdzie przepływ w uszkodzonej kończynie oceniano jako stosunek perfuzji krwi w kończynie uszkodzonej do perfuzji krwi w kończynie zdrowej stosując parametr PU (ang. *perfusion unit*).

3.3.2.4. Analiza histologiczna tkanek kończyny *post mortem* - Badania immunohistochemiczne i biochemiczne

W celu oceny procesów regeneracji tkanek mięśniowych przy użyciu metod biochemicznych oraz immunohistochemicznych, tj. produkcji tlenku azotu (NO) oraz anionu nadtlenkowego (O_2^-), aktywacji szlaków proangiogennych oraz stopnia neowaskularyzacji w tych tkankach, w 21 dniu od zabiegu LI, zwierzęta poddawano eutanazji, a następnie pobierano od nich tkanki.

Pobieranie tkanek

Zwierzęta poddawano eutanazji z zastosowaniem CO₂, a następnie pobierano tkanki mięśniowe z kończyn dolnych. Każdy wyizolowany mięsień dzielono na 4 części przeznaczone na badanie: 1) i 2) produkcji NO i O₂⁻, 3) aktywacji szlaków związanych z angiogenezą metodą Western blot oraz 4) barwienie immunohistochemiczne; zgodnie z protokołami przedstawionymi poniżej. Płytkę 12 dołkową (BD Falcon) zawierającą fragmenty mięśni przechowywano bardzo krótko na lodzie do momentu zabezpieczenia tkanek na poszczególne analizy.

3.3.2.4.1. Pomiar produkcji tlenku azotu (NO) oraz anionu ponadtlenkowego (O₂⁻) techniką Elektronowego Rezonansu Paramagnetycznego (EPR)

W przypadku badania NO w pobranych tkankach, w dniu poprzedzającym zakończenie doświadczenia, przygotowano bufor Krebsa-NO zawierający: chlorek sodu (NaCl, st. końcowe: 58,44 mM, Sigma-Aldrich), chlorek potasu (KCl, st. końcowe: 4,69 mM, Sigma-Aldrich), chlorek wapnia dwuwodny (CaCl₂·2H₂O, st. końcowe: 2,50 mM, EMD Millipore), siarczan (VI) magnezu siedmiowodny (MgSO₄·7H₂O, st. końcowe: 1,10 mM, EMD Millipore), wodorofosforan (V) dipotasu (K₂HPO₄, st. końcowe: 0,8 mM, Sigma-Aldrich), wodorowęglan (IV) sodu (NaHCO₃, st. końcowe: 25,00 mM Sigma-Aldrich), glukozę (st. końcowe: 11,10 mM, Sigma-Aldrich), bufor HEPES (st. końcowe: 20,00 mM, Sigma-Aldrich). 3,6 mg DETC (ang. silver diethyldithiocarbamate; Sigma-Aldrich) oraz 2,3 mg siarcznanu (VI) żelaza (II) (FeSO₄; Sigma-Aldrich) rozpuszczano indywidualnie każdy w 10 ml zimnego (+4°C) buforu Krebsa-NO odgazowanego przy użyciu N₂ (przez 20 min.), a następnie mieszano oba roztwory otrzymując roztwór Fe(DETC)₂ o st. końcowym równym 0,4 mM. Roztwór odgazowano przy użyciu N₂ (przez 20 min.). Pobrane fragmenty mięśni inkubowano w 0,4 mM roztworze koloidu Fe(DETC)₂ przez 45 min w 37°C. Po skończonej inkubacji, fragmenty mięśni umieszczano w odgazowanym roztworze koloidu Fe(DETC)₂ w strzykawkach 1 ml (BD), a następnie szybko zamrażano w oparach ciekłego N₂.

W przypadku badania O₂⁻ w pobranych tkankach, w dniu poprzedzającym zakończenie doświadczenia, przygotowano bufor Krebsa z buforem HEPES chelatowany deferoksamina zawierający CMH (ang. *1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidine*, st. końcowe: 500,00 µM, Noxygen), deferoksamina (st. końcowe: 25,00 µM, Sigma-Aldrich) oraz DETC (st. końcowe: 5,00 µM, Sigma-Aldrich). Tkanki inkubowano w przygotwanym buforze przez 45 min. w 37°C.

Wymieniony powyżej Bufor Krebsa z HEPES zawierał: NaCl (st. końcowe: 99,00 mM, Sigma-Aldrich), KCl (st. końcowe: 4,69 mM, Sigma-Aldrich), CaCl₂·2H₂O (st. końcowe: 2,50 mM, EMD Millipore), MgSO₄·7H₂O (st. końcowe: 1,20 mM EMD Millipore), KH₂PO₄ (st. końcowe: 1,03 mM Sigma-Aldrich), NaHCO₃ (st. końcowe: 25,00 mM Sigma-Aldrich), glukozę (st. końcowe: 5,60 mM Sigma-Aldrich), sól Na-HEPES (st. końcowe: 20,00 mM Sigma-Aldrich). Do 20 ml zimnego (+4°C), buforu Krebsa z HEPES odgazowanego przy użyciu N₂ (20 min.) dodawano następnie deferoksamina oraz DETC (Sigma-Aldrich), natomiast CMH (Noxygen) bezpośrednio przed włożeniem tkanki do roztworu. Po skończonej inkubacji, fragmenty mięśni umieszczano w odgazowanym

roztworze Krebs-HEPES-CMH w strzykawkach 1 ml (BD), a następnie szybko zamrażano w oparach ciekłego N₂.

Pomiar produkcji NO oraz O₂⁻ w tkankach wykonano przy użyciu spektrometru Miniscope MS200 (Magnettech) dla następujących parametrów pomiaru: *10 mW of microwave power, 1 mT of amplitude modulation frequency, 60 s of sweep time* oraz *3 scans*.

3.3.2.4.2. Badanie ekspresji białek związanych z angiogenezą w tkankach

Technikę Western blot - zoptymalizowaną w celu oceny markerów białkowych w lizatach tkankowych - wykorzystywano w celu identyfikacji markerów związanych z aktywacją szlaków proangiogennych w mięśniach szkieletowych pobranych od myszy, którym podawano MSC-EVs w odniesieniu do myszy grupy kontrolnej.

W tym celu, fragmenty mięśni świeżo wyizolowane od myszy w 21 dniu od zabiegu niedokrwienego uszkodzenia kończyny LI, umieszczano w próbkach o objętości 1,5 ml typu Eppendorf (Eppendorf), a następnie zamrażano w oparach ciekłego N₂.

Przed wykonaniem analizy Western blot, fragmenty mięśni zawieszano w buforze lizującym zawierającym 1% SDS (Fluka Chemie), 10 mM hydrochlorek Tris (Tris-HCl; Sigma-Aldrich), 1 mM ortowanadan sodu (Na₃VO₄; Sigma-Aldrich) oraz koktajl inhibitorów proteaz (*Halt Protease Inhibitor Cocktail*, 100X, Thermo Scientific) w stosunku ilościowym 1 µl inhibitorów proteaz/ 100 µl buforu lizującego, a następnie rozdrabniano przy użyciu homogenizatora Polytron Pro 250 (Pro Scientific). Po odwirowaniu lizatów z prędkością 14 000xg, 10 min., w temp. 4°C, nadsącze przeniesiono do nowych probówek, a następnie oznaczano stężenie białka w każdej próbce wykorzystując metodę Bradforda (zgodnie z procedurą zamieszczoną w podrozdziale 3.2.6.).

Do przeprowadzenia rozdzielania elektroforetycznego wykorzystano zestaw *Mini Protean 3* (Bio-Rad). W celu przygotowania próbek, do objętości każdej próbki lizatu - zawierającego 80 µg białka - dodawano po 4 µl buforu redukującego (*NuPAGE Sample Reducing Agent*; ThermoFisher Scientific) oraz 10 µl buforu obciążającego (*NuPAGE LDS Sample Buffer*; ThermoFisher Scientific), a następnie denaturowano próbki w temp. 70°C przez 10 min. Przygotowane próbki nakładano na studzienki żelu poliakrylamidowego *NuPAGE 4-12% Bis-Tris Protein Gel* (ThermoFisher Scientific). W celu oceny masy molekularnej rozdzielanych białek, na żel nakładano także barwny marker *ProSieve QuadColor Protein Marker* (4,6 - 300,0 kDa; Lonza). Elektroforezę prowadzono w buforze elektrodowym *NuPAGE MOPS SDS Running Buffer 1X* (ThermoFisher Scientific) w warunkach redukujących stosując napięcie 140 V przez 90 min. Transfer na membranę PVDF (Millipore) wykonywano w *Transfer Buffer 1X* (Bio-Rad) stosując napięcie 110 V przez 90 min w temp. +4°C, a następnie membranę podbarwiono przy użyciu *Ponceau S Solution* (Sigma-Aldrich). Po trzykrotnym przepłukaniu membrany buforem TBS-T (10 mM Tris/base pH 7.5, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% Tween 20), blokowano niespecyficzne miejsca wiązania przeciwciał przy użyciu buforu TBS-T zawierającego 5% BSA (Sigma-Aldrich) przez 90 min., w temp. pokojowej.

Membrany inkubowano z przeciwciałami I rzędownymi wymienionymi w Tabeli 23 przez całą noc, w temp. 4°C, a następnie po trzykrotnym przepłukaniu buforem TBS-T (5 min. inkubacji dla każdego płukania), membrany inkubowano przez 90 min. w temp. pokojowej z przeciwciałami II-rzędowymi sprzężonymi z peroksydazą chrzanową (ang. *horseradish peroxidase*, HRP) (Tabela 23). Po odpłukaniu niezwiązanych przeciwciał (5-0 krotne płukanie; po 2 min. każde, w buforze TBS-T), membrany inkubowano z chemiluminescencyjnym substratem dla HRP obecnym z zestawie do barwienia-ImmunoCruz ABC kit (Santa Cruz Biotechnology) - zgodnie z protokołem producenta.

Membrany wizualizowano cyfrowo przy użyciu Image Reader Las-3000 (Fujifilm), a następnie wykonywano analizę densytometryczną wykorzystując program ImageJ, w celu ilościowej analizy uzyskanych danych. Wyniki pomiarów fosforylowanych form białek przedstawiano w stosunku do białek nieufosforylowanych po ich normalizacji względem białka referencyjnego - β -aktyny.

Tabela 23. Lista przeciwciał wykorzystywanych w analizie Western blot.

	Przeciwciało przeciwno	Stosowane rozcieńczenie	Pochodzenie	Producent	Masa molekularna [kDa]
Przeciwciało I-rzędowe	β -aktyna	1:5000	mysie	Sigma-Aldrich	42
	Akt	1:1000	królicze	Cell Signaling	60
	P-Akt (Ser473)	1:2000	królicze	Cell Signaling	60
	eNOS	1:5000	mysie	BD Bioscience	140
	P-eNOS	1:1000	królicze	Cell Signaling	140
	VEGF	1:1000	królicze	Santa Cruz Biotechnology	21-42
Przeciwciało II-rzędowe	HRP Anty-mysie	1:5000	owcze	Amersham Biosciences	-
	HRP Anty-królicze	1:20000	ośle	Amersham Biosciences	-

3.3.2.4.3. Barwienie immunofluorecencyjne skrawków mroźniowych

W celu oceny ilości naczyń krwionośnych powstałych w tkankach mięśniowych w następstwie ich niedotlenienia oraz podania EVs, pobrane tkanki mięśniowe umieszczano w foremkach *Shandon Disposable Base Molds* (Fisher Scientific) w medium mroźniowym *Shandon Cryomatrix* (Thermo Scientific), a następnie zamrażano w oparach ciekłego N₂. Tak przygotowane tkanki przechowywano w temp. -80°C do czasu ich barwienia immunofluorecencyjnego.

Bloczki mroźniowe krojone przy użyciu kriostatu *Leica CM3050 S* (Leica Biosystems) na skrawki o grubości 7-8 μ m, umieszczano na szkiełkach typu *Menzel Gläser SUPERFROST Plus* (Thermo Scientific) opłaszczonych roztworem poly-L-lizyny (st. końcowe: 0,01%, Sigma-Aldrich). Skrawki mroźniowe utrwalano następnie przy użyciu zmrożonego 99% metanolu (Sigma-Aldrich) przez 5 min., w temp. -20°C, a następnie trzykrotnie płukano przygotowanym buforem dedykowanym do barwień

immunofluorescencyjnych (bufor BI, zawierający: 137,0 mM NaCl, 2,1 mM KCl, 6,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, Sigma-Aldrich). Niespecyficzne miejsca wiązania blokowano przy użyciu buforu BI z dodatkiem 5% roztworu BSA (Sigma-Aldrich) przez 90 min., w temp. pokojowej, a następnie pięciokrotnie płukano szkiełka w/w buforem (5 min. każde).

W celu detekcji procesów neowaskularyzacji tkanek mięśniowych, skrawki inkubowano przez całą noc (12h), w temp. 4°C - z przeciwciałem I-rzędowym skierowanym przeciwko markerowi komórek śródbłónka naczyń (szczurze przeciwciało anti-mysie CD31; BD Pharmingen), rozcieńczonym w stosunku 1:100 w buforze BI. Po inkubacji, szkiełka płukano pięciokrotnie w roztworze BI (5 min. każde), a następnie inkubowano przez 90 min., w temp. pokojowej, bez dostępu światła - z przeciwciałem II-rzędowym skoniugowanym z FITC (kozie przeciwciało skierowane przeciwko szczurzym immunoglobulinom; SouthernBiotech), rozcieńczonym w buforze BI w stosunku 1:100.

Preparaty następnie dwukrotnie płukano w roztworze BI (5 min.), wybarwiano jądra komórkowe przy użyciu roztworu DAPI (st. końcowe 300 nM; Sigma-Aldrich) przez 3 min, w temp. pokojowej, w ciemności, po czym trzykrotnie płukano w buforze BI (5 min.), a następnie zamykano preparaty przy użyciu medium *Vectashield Mounting Medium* (Vector Laboratories). Wykonane preparaty analizowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 710 (Carl Zeiss).

3.4. Analiza statystyczna wyników

Analiza statystyczna uzyskanych wyników przeprowadzona została za pomocą testu t-studenta lub testu U Manna-Whitneya przy użyciu programu GraphPad Prism 8. Liczbę powtórzeń eksperymentów oraz liczbę zwierząt w doświadczeniach, podano każdorazowo w opisie wyników, w dalszej części pracy.

4. WYNIKI

4.1. Charakterystyka fenotypowa i funkcjonalna mysich komórek MSCs

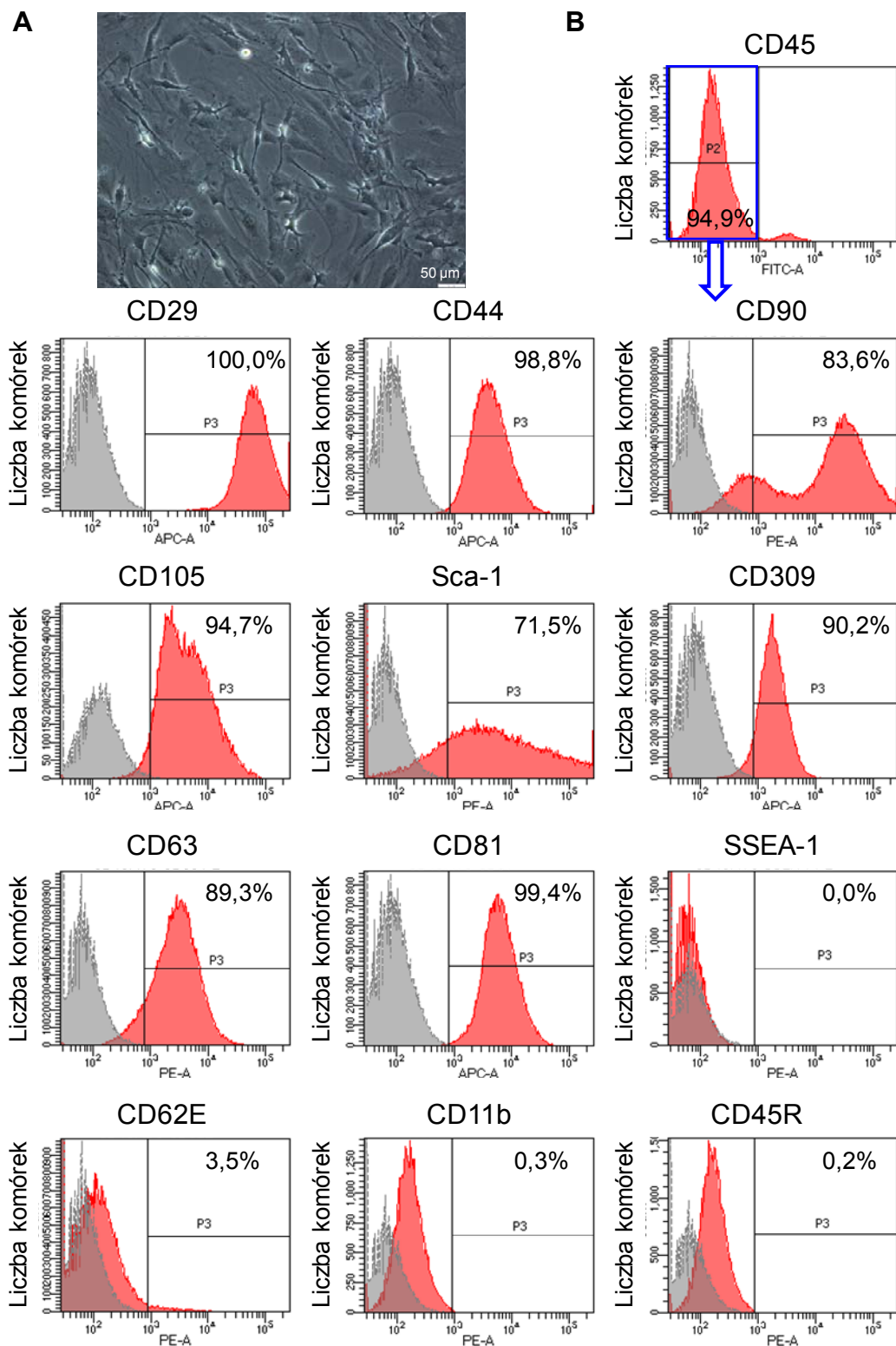
Komórki MSCs izolowano z mysiego szpiku kostnego dzięki ich zdolności do adhezji do polistyrenowych powierzchni naczyń hodowlanych. W celu oceny homogenności uzyskanej kultury, komórki na pasażu 4 poddano charakterystyce fenotypowej oraz funkcjonalnej. We wcześniejszych moich badaniach wykazałam, że komórki adherentne szpiku kostnego (wśród których znajdują się komórki MSCs), na początkowych etapach hodowli wykazują swoiste „zanieczyszczenie” komórkami hematopoetycznymi linii monocytarno-makrofagowej ($CD45^+/CD11b^+$), które wypasążowują się w miarę postępu hodowli (tj. w pasażach 1-3) i dlatego w niniejszych badaniach stosowałam komórki będące pomiędzy pasażem 4, a pasażem 6 hodowli (P4-P6).

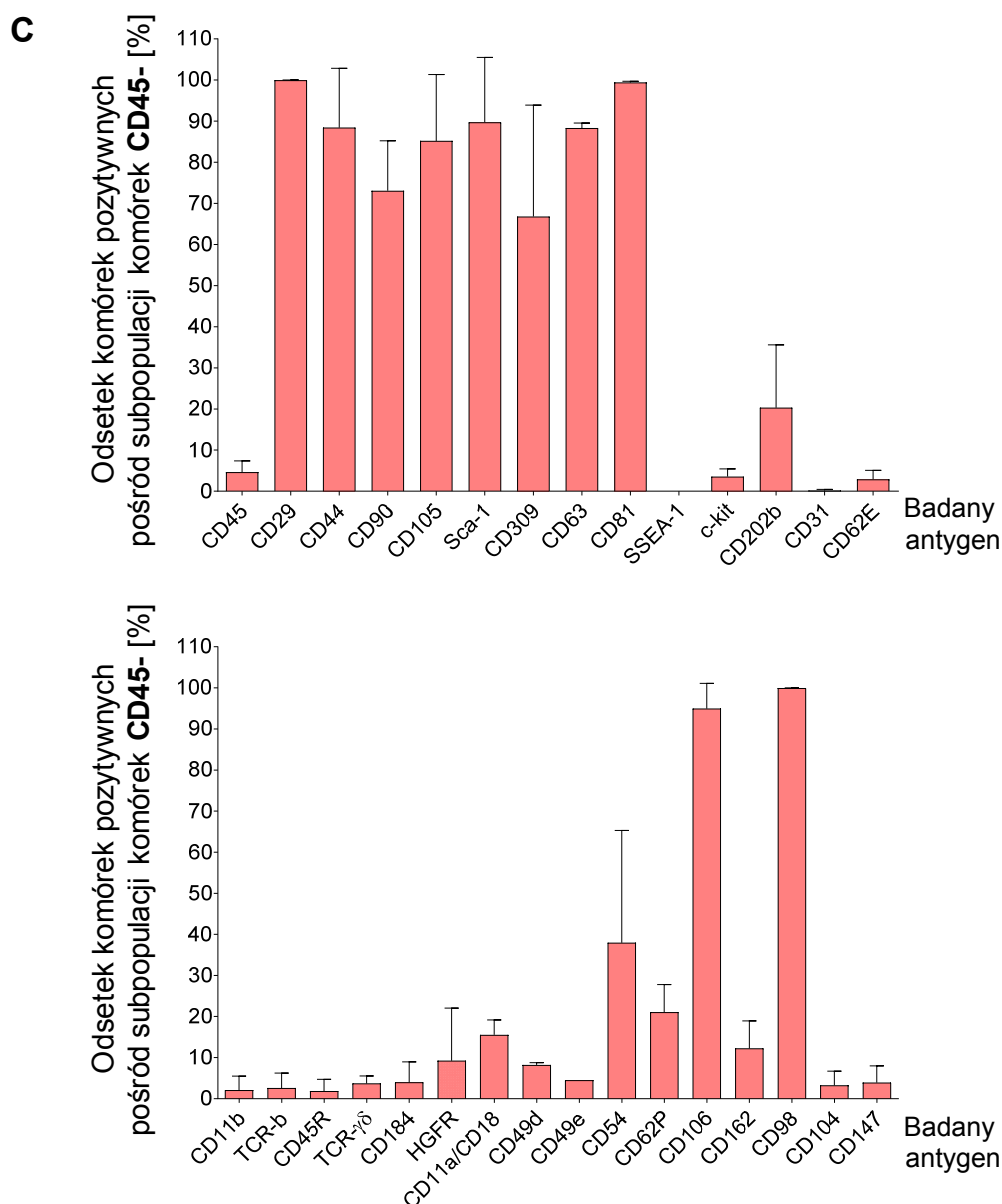
Analizy wykonywano zgodnie z zaleceniami opublikowanymi przez Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej odnośnie identyfikacji komórek MSCs pochodzących z tkanek ludzkich (79), które zaimplementowano w niniejszej pracy dla komórek MSCs pochodzenia mysiego.

W pierwszym etapie realizacji badań potwierdzono prawidłową morfologię komórek MSCs wyizolowanych poprzez adhezję do polistyrenowych powierzchni naczyń hodowlanych (Rycina 13A), a następnie wykonano ich charakterystykę fenotypową dzięki zastosowaniu wielokolorowej cytometrii przepływowej (Rycina 13B, C). Wykazano, że frakcja komórek adherentnych mysiego szpiku kostnego (na pasażu 4) zawierała w znaczącym odsetku niehematopoetyczne komórki $CD45^-$ ($95,4 \pm 2,8\%$) (Rycina 13C). W dalszym etapie, komórki $CD45^-$ charakteryzowano pod kątem występowania na ich powierzchni innych wybranych markerów występujących na komórkach macierzystych i progenitorowych (Rycina 13B). Zaobserwowano, że komórki $CD45^-$ wykazują wysoki stopień ekspresji markerów charakterystycznych dla komórek MSCs, takich jak: CD29, CD44, CD90, CD105 oraz Sca-1, przy równoczesnym braku ekspresji: *i*) markerów komórek pluripotencjalnych (SSEA-1) oraz hematopoetycznych komórek progenitorowych (c-kit), *ii*) komórek śródbłónki (CD31, CD62E) oraz *iii*) dojrzałych komórek krwi (CD11b, TCR- β , CD45R, TCR- $\gamma\delta$) (Rycina 13B, C). Komórki MSCs wykazują również wysoką ekspresję tetraspanin (CD63, CD81), zmienny poziom ekspresji receptora dla VEGF (CD309) oraz bardzo niski poziom ekspresji receptorów dla SDF-1 (CD184) oraz dla czynnika HGF (HGFR). Dane ilościowe tych analiz przedstawiono na Rycinie 13C.

Biorąc pod uwagę występowanie cząsteczek adhezyjnych oraz białek odpowiedzialnych za oddziaływanie ze śródbłónką naczyniowym, na powierzchni komórek MSCs zaobserwowano występowanie antygenu CD106 (cząsteczki VCAM) oraz zmienny (pomiędzy powtórzeniami biologicznymi) poziom ekspresji antygenu CD54 (cząsteczki ICAM-1) oraz praktycznie brak występowania następujących antygenów: CD11a/CD18, CD49d, CD49e, należących do grupy integryn. Dodatkowo, na powierzchni komórek MSCs ($CD45^-$) zidentyfikowano antygen CD98, charakterystyczny dla komórek aktywnych metabolicznie (Rycina 13C). Ocena obecności oraz poziomu ekspresji tych

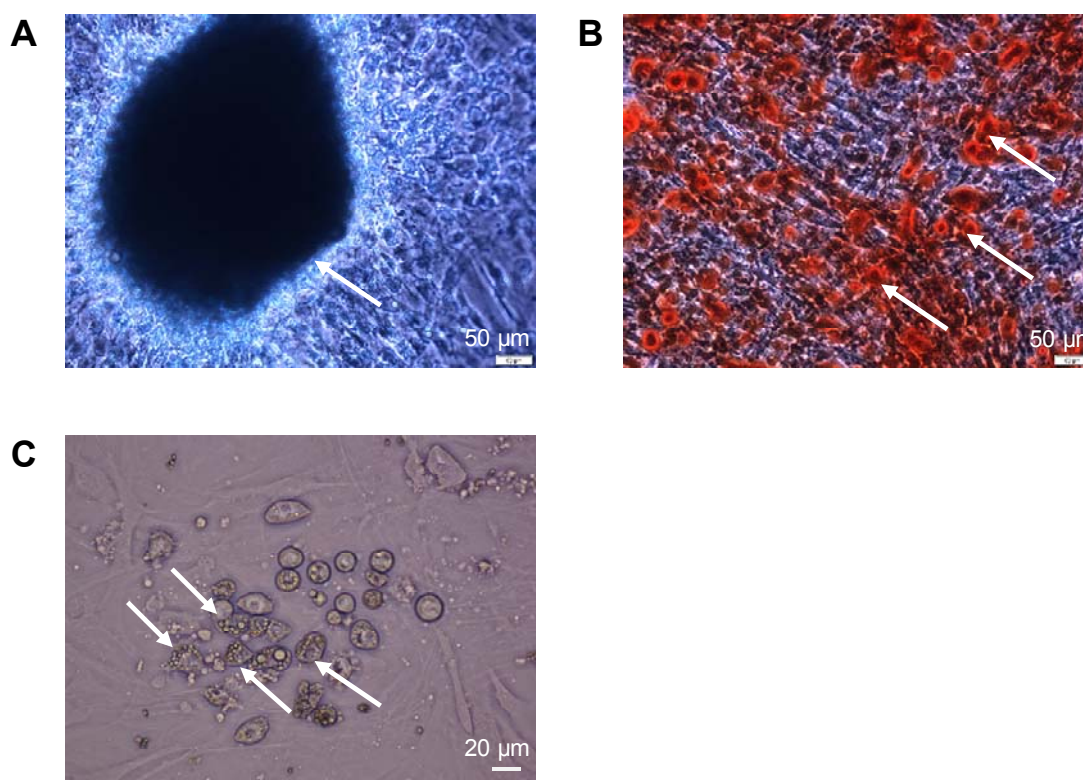
molekuł w mysich komórkach MSCs była istotna z punktu widzenia dalszej oceny fenotypu oraz funkcji ich pęcherzyków zwnątrzkomórkowych, co wykonano w dalszej części pracy.





Rycina 13. Morfologia oraz profil wieloantygenowy mysich szpikowych komórek MSCs.
A. Morfologia komórek MSCs na pasażu 4 – analiza w mikroskopii świetlnej. Skala = 50 μ m. **B.** Reprezentatywne histogramy z przykładowej analizy cytometrycznej profilu antygenowego komórek MSCs (na pasażu 4) z uwzględnieniem markerów charakterystycznych dla: komórek mezenchymalnych (CD29, CD44, CD90, CD105, Sca-1), komórek pluripotencjalnych (SSEA-1), komórek endotelialnych (CD62E), komórek krwi (CD45, CD45R, CD11b), obecności tetraspanin (CD63, CD81) oraz receptora dla VEGF (VEGFR2). Na histogramach przedstawiono złożenie pików dla próbki niebarwionej, przedstawiający autofluorescencję komórek w danym kanale (pik szary) oraz barwionej określonym przeciwciałem (pik czerwony). Komórki analizowano pod kątem obecności markera leukocytarnego CD45, a następnie pod kątem występowania w/w markerów. Na histogramach zamieszczono wartości procentowe ekspresji analizowanych antygenów pośród komórek CD45⁺ w przykładowym eksperymencie. **C.** Ocena ilościowa ekspresji wybranych antygenów w populacji komórek CD45⁺. Wartości liczbowe (średnia $\pm$ SD) określają procent komórek pozytywnych pod względem badanego antygenu pośród wszystkich komórek CD45⁺. N=3.

W kolejnym etapie, komórki MSCs poddano różnicowaniu w kierunku osteoblastów, chondrocytów oraz adipocytów przy użyciu komercyjnie dostępnych pożywek różnicujących - w celu potwierdzenia ich potencjału multipotencjalnego (Rycina 14). Komórki MSCs zróżnicowane w kierunku osteoblastów i chondrocytów identyfikowano na podstawie barwień histochemicznych, natomiast komórki zróżnicowane w kierunku adipocytów – przy użyciu obserwacji mikroskopowych identyfikujących komórki z widocznymi kroplami tłuszczu w cytoplazmie. Komórki różnicujące w kierunku chondrocytów wykazywały widoczne depozyty glikozaminoglikanów (niebieskie kule) po wybarwieniu błękitem alcjańskim (Rycina 14A), natomiast osteoblasty wykazywały znaczną mineralizację po wybarwieniu czerwienią alizarynową (Rycina 14B). Jak wspomniano wyżej, adipocyty identyfikowano na podstawie obecności lipoprotein odkładających się w cytoplazmie tych komórek podczas adipogenezy (Rycina 14C).



Rycina 14. Ocena potencjału różnicowania mysich komórek MSCs. Reprezentatywne zdjęcia przedstawiają wynik prowadzonego: **A.** Różnicowania chondrogennego (trwającego przez 15 dni), **B.** Różnicowania osteogennego (trwającego przez 15 dni). **C.** Różnicowania w kierunku adipocytów (trwającego przez 11 dni). Strzałkami zaznaczono komórki MSCs o właściwym zróżnicowanym fenotypie.

Podsumowując, wykonana charakterystyka fenotypowa i funkcjonalna mysich komórek MSCs szpiku kostnego potwierdziła właściwy fenotyp oraz potencjał różnicowania dla tych komórek, na podstawie kryteriów charakterystycznych dla komórek MSCs.

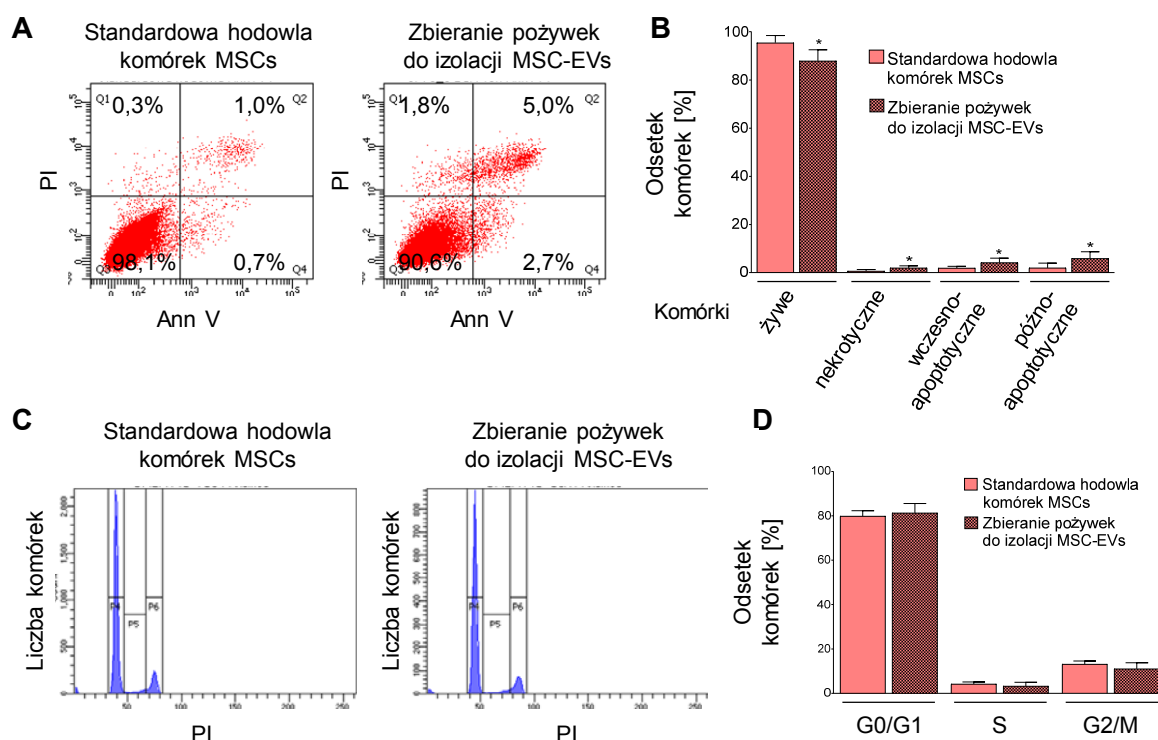
4.2. Pozyskiwanie pożywek kondycjonowanych z hodowli komórek MSCs w celu izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

W celu izolacji MSC-EVs, mysie komórki MSCs na pasażach 4-6, umieszczano w pożywce do izolacji MSC-EVs - DMEM/F12 suplementowanej 0,5% BSA (bez surowicy) na 24h, a następnie zbierano pożywkę kondycjonowaną zawierającą m.in. MSC-EVs. Komórki rodzicielskie (MSCs) analizowano pod kątem ich żywotności oraz cyklu komórkowego. W badaniach stosowano pożywkę bezsurowiczą w celu izolacji MSC-EVs pozbawionych zanieczyszczenia pęcherzykami pochodzącymi z surowicy, co jest zgodne z zaleceniami Towarzystwa Naukowego ISEV (167).

Wykazano, że komórki MSCs inkubowane w w/w pożywce bezsurowiczej, dedykowanej izolacji MSC-EVs, wykazywały nieznacznie obniżoną żywotność w porównaniu do komórek hodowanych w pełnej pożywce DMEM/F12 suplementowanej 10% FBS (odpowiednio, $87,9 \pm 4,6\%$ vs. $95,9 \pm 2,9\%$, Rycina 15A, B). Przykładowe dotploty z analizy żywotności komórek MSCs techniką cytometrii przepływowej, obejmujące także rozkład procentowy subpopulacji komórek nekrotycznych, wczesno- oraz późnoapoptotycznych, przedstawiono na Rycinie 15A.

Następnie wykonano badanie cyklu komórkowego komórek MSCs, które wykorzystano do izolacji MSC-EVs (Rycina 15C, D). Wykazano, że komórki MSCs - znad których zbierano pożywkę do izolacji MSC-EVs, znajdowały się głównie w fazie G0/G1 cyklu komórkowego ($81,3 \pm 4,3\%$ wszystkich komórek w hodowli), co nie odbiegało znacząco od komórek MSCs utrzymywanych w standardowej hodowli ($79,9 \pm 2,4\%$ komórek). Odsetek komórek w fazie S, podczas której odbywa się replikacja DNA, był porównywalny dla komórek inkubowanych w pożywce bezsurowiczej oraz do komórek hodowanych w pożywce suplementowanej FBS i wynosił odpowiednio $3,2 \pm 1,7\%$ oraz $4,2 \pm 0,9\%$. Podobnie, odsetek komórek MSCs w fazie G2 oraz M był także porównywalny dla komórek MSCs inkubowanych w pożywce suplementowanej 0,5% BSA oraz 10% FBS ($11,1 \pm 2,7\%$ vs. $13,1 \pm 1,4\%$). Uzyskane wyniki świadczą o tym, że komórki MSCs znad których zbierano pożywkę do izolacji MSC-EVs cechowały się wysoką żywotnością oraz znajdowały się głównie w fazie G0/G1 cyklu komórkowego.

Podsumowując, badania kontrolne komórek MSCs – z hodowli których zbierano pożywki kondycjonowane do izolacji MSC-EVs, wykazywały niewielki spadek żywotności względem komórek kontrolnych oraz nie zaobserwowano różnic w przebiegu faz cyklu komórkowego, w odniesieniu do komórek MSCs hodowanych w standardowej, pełnej pożywce hodowlanej. W związku z powyższym pozyskane pożywki kondycjonowano procesowano w dalszej części pracy celem pozyskania MSC-EVs stosowanych do dalszych badań.



Rycina 15. Ocena żywotności i cyklu komórkowego MSCs po zebraniu pożywki kondycjonowanej do izolacji MSC-EVs. Dane przedstawiają kondycję komórek MSCs inkubowanych przez 24h w pożywce bezsurowiczej, w porównaniu do standardowego pełnego medium hodowlanego. **A.** Reprezentatywne dot-ploty z pojedynczej analizy żywności komórek techniką cytometrii przepływowej. Na wykresach przedstawiono odsetek komórek w każdym kwadracie, świadczących o obecności komórek nekrotycznych (Q1), późnoapoptotycznych (Q2), wczesnoapoptotycznych (Q3) oraz żywych (Q4). Oznaczenia: PI- jodek propidyny, Ann V- aneksyna V. **B.** Analiza ilościowa żywotności komórek MSCs. Wartości przedstawiają: Średnia $\pm$ SD, * $P < 0,05$; (test t-studenta), $N = 5$ /grupę. **C.** Reprezentatywne histogramy z przykładowej analizy cyklu komórkowego techniką cytometrii przepływowej. **D.** Analiza ilościowa odsetka komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego. Wartości przedstawiają: Średnia $\pm$ SD, (test t-studenta), $N = 3$ /grupę.

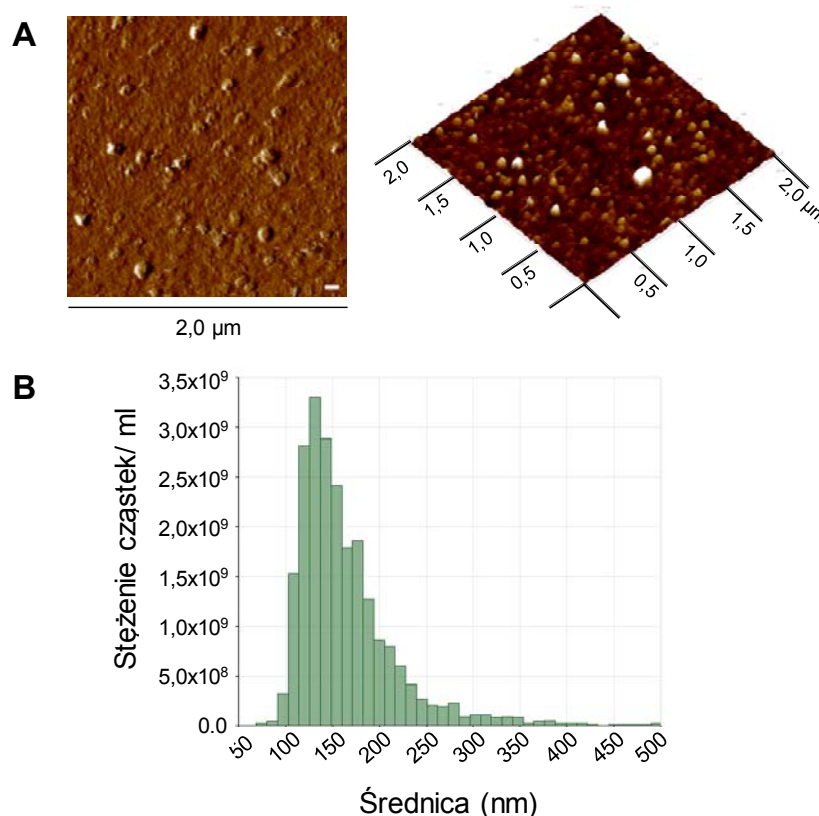
4.3. Ocena morfologii i wielkości pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z hodowli komórek MSCs

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe izolowano z pożywek kondycjonowanych zebranych z hodowli komórek MSCs, metodą sekwencyjnego wirowania obejmującego dwa cykle ultrawierowania. Schemat procesu izolacji MSC-EVs z pożywek kondycjonowanych został przedstawiony na Rycinie 7.

Zgodnie z zaleceniami Towarzystwa Naukowego ISEV (167), w celu potwierdzenia obecności integralnych pęcherzyków w izolowanych próbkach oraz oceny ich morfologii, izolaty MSC-EVs obrazowano techniką mikroskopii sił atomowych (ang. *atomic force microscopy*, AFM). W odróżnieniu od transmisyjnej mikroskopii elektronowej, metoda obrazowania AFM umożliwia wizualizację preparatów w czasie rzeczywistym oraz nie wymaga etapu utrwalania analizowanego materiału, co znacznie

zmniejsza ryzyko zniekształcenia kształtów EVs podczas przygotowania preparatów do obrazowania. Dodatkowo, obrazowanie techniką AFM jest jednym z dwóch sposobów obrazowania EVs zalecanych przez Towarzystwo Naukowe ISEV (167). Analiza zdjęć preparatów wykonanych w płaszczyźnie dwu- (2D) oraz trójwymiarowej (3D) wykazała, że badane próbki zawierają cząsteczki o kulistym kształcie i zróżnicowanej wielkości, co wskazuje na wzbogacenie preparatów w pęcherzyki o prawidłowej morfologii (Rycina 16A).

W kolejnym etapie, zbadano rozkład wielkości MSC-EVs techniką TRPS (ang. *Tunable Resistive Pulse Sensing*) przy użyciu systemu IZON qNano, umożliwiającą dokładną ocenę wielkości EVs. Wykonane badania wykazały, że MSC-EVs stanowią heterogenną populację cząsteczek o średniej wielkości równej $172,3 \pm 14,4$ nm oraz dominancie (tj. wartości najczęściej występującej) wynoszącej $138,0 \pm 14,7$ nm (Rycina 16B, Tabela 24). W analizowanych preparatach, MSC-EVs występują w przedziale wielkości cząstek od 70 do 420 nm, co mieści się w typowym zakresie wielkości EVs opisywanym w literaturze, jako 40-600 nm (212,213), typowym dla frakcji egzosomów i ektosomów.



Rycina 16. Analiza morfologii oraz rozkładu wielkości MSC-EVs. A. Obraz morfologii powierzchni próbki MSC-EVs wykonany techniką mikroskopii AFM dla rozmiaru skanu 2,0 μm x 2,0 μm (strona lewa). Trójwymiarowa prezentacja obrazu tego samego zdjęcia (strona prawa). Na zdjęciu widoczne są pojedyncze pęcherzyki o zachowanej integralności oraz morfologii. B. Reprezentatywny rozkład wielkości MSC-EVs wykonany techniką TRPS przy użyciu systemu IZON qNano.

Tabela 24. Zestawienie średnicy wielkości oraz dominanty wielkości MSC-EVs. Kolumna druga przedstawia wartości średnicy wielkości dla trzech wybranych preparatów MSC-EVs oraz średnią $\pm$ SD z tych pomiarów. W kolumnie trzeciej przedstawiono dominantę (wartość modalną) dla badanych preparatów oraz średnią dominantę $\pm$ SD. N= 3.

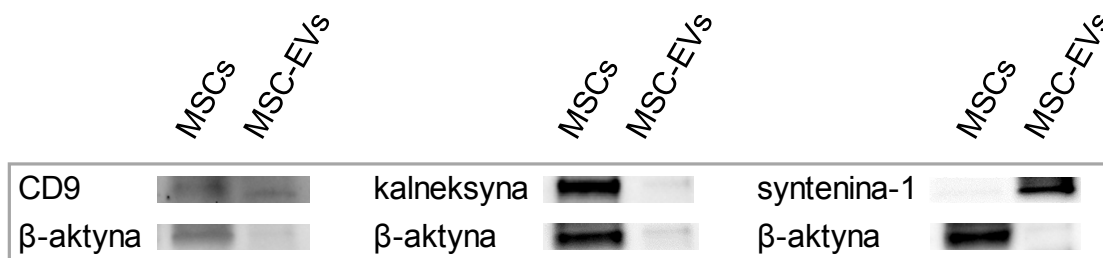
	Średnia wielkość [nm]	Dominanta [nm]
Preparat 1	189	154
Preparat 2	164	135
Preparat 3	164	125
Średnia $\pm$ SD	172,3 $\pm$ 14,4	138,0 $\pm$ 14,7

Podsumowując, dzięki przeprowadzonym badaniom potwierdzono, że wyizolowane preparaty zawierają kuliste, integralne nanocząstki o średnicy wielkości charakterystycznej dla EVs i wynoszącej $172,3 \pm 14,4$ nm. Wyizolowane preparaty MSC-EVs stosowano w dalszych badaniach.

4.4. Charakterystyka MSC-EVs na podstawie obecności markerów EVs

Wykorzystana w niniejszej pracy metoda izolacji EVs na drodze sekwencyjnego wirowania, umożliwia otrzymywanie preparatów heterogennych, które zawierają większe ektosomy oraz mniejsze egzosomy. Zgodnie z aktualnie dostępną literaturą, nanocząstki te mogą posiadać markery charakterystyczne dla nich, dzięki którym możliwa jest identyfikacja w/w frakcji EVs (166). W związku z tym, zgodnie z zaleceniami towarzystwa ISEV (166), poza analizą rozkładu wielkości i morfologii EVs, wskazane jest zbadanie występowania w otrzymanych preparatach wybranych markerów, które jednoznacznie pozwolą zidentyfikować obecność EVs w otrzymanych próbkach.

W związku z powyższym, w celu oceny obecności oraz heterogenności MSC-EVs w izolowanych preparatach, wykonano analizę metodą Western blot w celu identyfikacji obecności synteniny-1 i tetraspaniny CD9 (markery EVs) oraz kalneksyny (marker negatywny) w próbkach, z zastosowaniem specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko w/w białkom. Otrzymane wyniki badań wykazały, że MSC-EVs - w przeciwieństwie do samych komórek MSCs, nie zawierają kalneksyny, która jest białkiem integralnym retikulum endoplazmatycznego (Rycina 17). Preparaty MSC-EVs były natomiast wzbogacone w synteninę-1 - białko występujące w cytoplazmie, które może wiązać się z błoną komórkową i które wskazuje się także, jako białko odróżniające preparaty EVs od lizatów całych komórek (166).



Rycina 17. Porównanie występowania wybranych białek w preparatach MSC-EVs oraz komórkach MSCs metodą Western blot. Analizowano występowanie białka błonowego-tetraspaniny CD9 oraz białka cytoplazmatycznego - synteniny-1, jak również białka występującego w retikulum endoplazmatycznym - kalneksyny w preparatach MSC-EVs oraz komórkach MSCs. W analizie zastosowano kontrolę endogenną - białko β-aktynę.

Marker charakterystyczny dla egzosomów (tetraspanina CD9) był również obecny we frakcjach MSC-EVs stosowanych w badaniach, co świadczy o wzbogaceniu frakcji MSC-EVs w egzosomy. W wykonanej analizie, została wykorzystana kontrola endogenna - β-aktyna, która jest białkiem cytoszkieletu powszechnie występującym w komórkach oraz oznaczanym podczas analiz Western blot. Warto podkreślić jednak, że β-aktyna występowała w próbkach z komórek MSCs oraz w bardzo niskim stopniu w samych MSC-EVs, co utrudnia proces standaryzacji i jest problemem ogólnie znanym w badaniach EVs. Jak dotąd, nie wyznaczono uniwersalnej kontroli endogennej dla próbek EVs, dlatego tego typu analizy normalizuje się w przypadku analiz Western blot - stosując tę samą wyjściową ilość białka.

W dalszym etapie, we współpracy z dr hab. Sylwią Kędracką-Krok z Zakładu Biochemii Fizycznej, Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, wykonano globalną analizę proteomiczną preparatów MSC-EVs oraz komórek MSCs, w celu identyfikacji białek wzbogaconych we frakcji MSC-EVs.

Otrzymane wyniki badań proteomicznych odnoszących się do próbek MSC-EVs, w pierwszej kolejności analizowano pod kątem obecności markerów białkowych najczęściej występujących w egzosomach, które identyfikowano m.in. dzięki ich obecności w bazie danych dedykowanych składowi molekularnemu EVs - ExoCarta (<http://exocarta.org>). Baza ta stanowi swoiste kompendium wiedzy na temat bioaktywnej zawartości egzosomów (143). Wykazano, że **w badanych preparatach MSC-EVs występują 82 białka często identyfikowane w egzosomach** (Tabela 25), co świadczy o wzbogaceniu tych preparatów we frakcję egzosomalną. W przeprowadzonej analizie potwierdzono występowanie w preparatach MSC-EVs m.in. następujących **grup białek** wskazywanych przez ISEV, jako istotne w identyfikacji EVs:

- białek transbłonowych z grupy tetraspanin – w tym tetraspaniny CD9, CD63, CD81;
- białek cytoplazmatycznych wiążących się do błony komórkowej – w tym m.in. synteniny-1, aneksyny A1, A6, A11;

- białek pozakomórkowych związanych z błoną komórkową – w tym m.in. fibronektyny.

W Tabeli 25 zamieszczono listę 100 białek najczęściej występujących w egzosomach opublikowaną na stronie ExoCarta z zaznaczeniem ich występowania w preparatach MSC-EVs.

Tabela 25. Lista 100 białek często identyfikowanych w egzosomach opublikowanych na stronie ExoCarta oraz ich występowanie w preparatach MSC-EVs. Plus (+) oznacza występowanie danego białka, natomiast (-) oznacza brak białka w badanych preparatach MSC-EVs. Do badania wykorzystano dane otrzymane z globalnej analizy proteomicznej MSC-EVs.

L.p.	Symbol genu kodującego białko	Kod UniProtKB	Nazwa białka	Występowanie w MSC-EVs
1	CD9	P40240	Antygen CD9 (ang. <i>CD9 antigen</i>)	+
2	HSPA8	P63017	Białko szoku cieplnego HSPA8 71 kDa (ang. <i>Heat shock 71 kDa protein 8</i>)	+
3	PDCD6IP	Q9WU78	Białko oddziałujące z białkiem programowanej śmierci komórki-6 (ang. <i>Programmed cell death 6-interacting protein</i>)	-
4	GAPDH	P16858	Dehydrogenaza gliceraldehydo-3-fosforanowa (ang. <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)	-
5	ACTB	P60710	Aktyna, izoforma cytoplazmatyczna 1 (ang. <i>Actin, cytoplasmic 1</i>)	+
6	ANXA2	P07356	Aneksyna A2 (ang. <i>Annexin A2</i>)	+
7	CD63	P41731	Antygen CD63 (ang. <i>CD63 antigen</i>)	+
8	SDCBP	O08992	Syntenina-1 (ang. <i>Syntenin-1</i>)	+
9	ENO1	P17182	α -enolaza (ang. <i>α-enolase</i>)	+
10	HSP90AA1	P07901	Białko szoku cieplnego HSP 90 α (ang. <i>Heat shock protein HSP 90α</i>)	+
11	TSG101	Q61187	Białko Tsg101- Białko genu 101 podatności na nowotwory (ang. <i>Tumor susceptibility gene 101 protein</i>)	+
12	PKM	P52480	Kinaza pirogronianowa PKM (ang. <i>Pyruvate kinase PKM</i>)	+
13	LDHA	P06151	Dehydrogenaza L- mleczanowa łańcuch α (ang. <i>L-lactate dehydrogenase α chain</i>)	+
14	EEF1A1	P10126	Czynnik elongacyjny 1- α 1 (ang. <i>Elongation factor 1-α 1</i>)	+
15	YWHAZ	P63101	Białko 14-3-3 ζ/δ (ang. <i>14-3-3 protein ζ/δ</i>)	+
16	PGK1	P09411	Kinaza fosfoglicerynianowa 1 (ang. <i>Phosphoglycerate kinase 1</i>)	+
17	EEF2	P58252	Czynnik elongacyjny 2 (ang. <i>Elongation factor 2</i>)	+
18	ALDOA	P05064	Aldolaza fruktozo-bisfosforanowa A (ang. <i>Fructose-bisphosphate aldolase A</i>)	+
19	HSP90AB1	P11499	Białko szoku cieplnego HSP90 β (ang. <i>Heat shock protein HSP 90-β</i>)	+
20	ANXA5	P48036	Aneksyna A5 (ang. <i>Annexin A5</i>)	+

21	FASN	P19096	Syntaza kwasów tłuszczowych (ang. <i>Fatty acid synthase</i>)	+
22	YWHAЕ	P62259	Białko 14-3-3 ε (ang. <i>14-3-3 protein ε</i>)	+
23	CLTC	Q68FD5	Klatryna łańcuch ciężki 1 (ang. <i>Clathrin heavy chain 1</i>)	+
24	CD81	P35762	Antygen CD81 (ang. <i>CD81 antigen</i>)	+
25	ALB	P07724	Albumina surowicza (ang. <i>Serum albumin</i>)	+
26	VCP	Q01853	ATPaza przejściowej formy retikulum endoplazmatycznego (ang. <i>Transitional endoplasmic reticulum ATPase</i>)	+
27	TPI1	P17751	Izomeraza tri-fosforanowa (ang. <i>Triosephosphate isomerase</i>)	+
28	PPIA	P17742	Izomeraza cis/trans peptydylo- prolinowa A (ang. <i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i>)	+
29	MSN	P26041	Moezyna (ang. <i>Moesin</i>)	+
30	CFL1	P18760	Kofilina 1 (ang. <i>Cofilin-1</i>)	+
31	PRDX1	P35700	Peroksyredoksyna 1 (ang. <i>Peroxiredoxin-1</i>)	+
32	PFN1	P62962	Profilina 1 (ang. <i>Profilin-1</i>)	+
33	RAP1B	Q99JI6	Białko Rap-1b związane z białkami Ras (ang. <i>Ras-related protein Rap-1b</i>)	+
34	ITGB1	P09055	Integryna β-1 (ang. <i>Integrin β-1</i>)	+
35	HSPA5	P20029	Chaperon BiP retikulum endoplazmatycznego (ang. <i>Endoplasmic reticulum chaperone BiP</i>)	-
36	SLC3A2	P10852	Łańcuch ciężki antygeny powierzchniowego 4F2 (ang. <i>4F2 cell-surface antigen heavy chain</i>)	+
37	HIST1H4A	P62806	Histon H4 (kodowany przez gen HIST1H4A; ang. <i>Histone H4</i>)	+
38	GNB2	P62880	Podjednostka β-2 białka G(I)/G(S)/G(T) wiążącego nukleotyd guaniny (ang. <i>Guanine nucleotide-binding protein subunit β-2</i>)	+
39	ATP1A1	Q8VDN2	Podjednostka α-1 ATPazy transportująca sód/ potas (ang. <i>Sodium/potassium-transporting ATPase subunit α-1</i>)	+
40	YWHAQ	P68254	Białko 14-3-3 θ (ang. <i>14-3-3 protein θ</i>)	+
41	FLOT1	O08917	Flotylin 1 (ang. <i>Flotillin-1</i>)	+
42	FLNA	Q8BTM8	Filamina-A (ang. <i>Filamin-A</i>)	+
43	CLIC1	Q9Z1Q5	Wewnątrzkomórkowe białko 1 kanału chlorkowego (ang. <i>Chloride intracellular channel protein 1</i>)	+
44	CDC42	P60766	Homolog białka 42 kontrolującego podział komórki (ang. <i>Cell division control protein 42 homolog</i>)	+
45	CCT2	P80314	Podjednostka β białka 1 kompleksu T (ang. <i>T-complex protein 1 subunit beta</i>)	+
46	A2M	Q6GQT1	α-2-makroglobulina-P (ang. <i>α-2-macroglobulin-P</i>)	+
47	YWHAG	P61982	Białko 14-3-3 γ (ang. <i>14-3-3 protein γ</i>)	+
48	TUBA1B	P05213	Łańcuch 1B tubuliny α (ang. <i>Tubulin α-1B chain</i>)	-
49	RAC1	P63001	Substrat 1 toksyny botulinowej C3	+

			spokrewnionej z białkiem Ras (ang. <i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>)	
50	LGALS3BP	Q07797	Białko wiążące galektynę-3 (ang. <i>Galectin-3-binding protein</i>)	+
51	HSPA1A	Q61696	Białko szoku cieplnego HSP1A 70 kDa (ang. <i>Heat shock 70 kDa protein 1A</i>)	+
52	GNAI2	P08752	Podjednostka alfa 2 białka G(i) wiążącego nukleotyd guaniny (ang. <i>Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2</i>)	+
53	ANXA1	P10107	Aneksyna A1 (ang. <i>Annexin A1</i>)	+
54	RHOA	Q9QUI0	Transformujące białko RhoA (ang. <i>Transforming protein RhoA</i>)	-
55	MFGE8	P21956	Laktadheryna (ang. <i>Lactadherin</i>)	+
56	PRDX2	Q61171	Peroksyredoksyna 2 (ang. <i>Peroxiredoxin-2</i>)	-
57	GDI2	Q61598	Inhibitor beta dysocjacji białka Rab GDP (ang. <i>Rab GDP dissociation inhibitor beta</i>)	+
58	EHD4	Q9EQP2	Białko 4 zawierające domenę EH (ang. <i>EH domain-containing protein 4</i>)	+
59	ACTN4	P57780	α -aktynina-4 (ang. <i>α-actinin-4</i>)	+
60	YWHAB	Q9CQV8	Białko 14-3-3 α/β (ang. <i>14-3-3 protein α/β</i>)	-
61	RAB7A	P51150	Białko Rab-7a związane z białkami Ras (ang. <i>Ras-related protein Rab-7a</i>)	+
62	LDHB	P16125	Dehydrogenaza L- mleczanowa łańcuch B (ang. <i>L-lactate dehydrogenase B chain</i>)	+
63	GNAS	P63094	Krótką izoformą podjednostki alfa białka G(s) wiążącego nukleotyd guaniny (ang. <i>Guanine nucleotide-binding protein G(s) subunit alpha isoform short</i>)	-
64	TFRC	Q62351	Białko 1 receptora dla transferyny (ang. <i>Transferrin receptor protein 1</i>)	+
65	RAB5C	P35278	Białko Rab-5c związane z białkami Ras (ang. <i>Ras-related protein Rab-5C</i>)	-
66	ARF1	P84078	Czynnik 1 ADP-rybozylacji (ang. <i>ADP-ribosylation factor 1</i>)	-
67	ANXA6	P14824	Aneksyna A6 (ang. <i>Annexin A6</i>)	+
68	ANXA11	P97384	Aneksyna A11 (ang. <i>Annexin A11</i>)	+
69	ACTG1	P63260	Aktyna, izoforma cytoplazmatyczna 2 (ang. <i>Actin, cytoplasmic 2</i>)	-
70	KPNB1	P70168	Podjednostka β -1 importyny (ang. <i>Importin subunit β-1</i>)	+
71	EZR	P26040	Ezryna (ang. <i>Ezrin</i>)	+
72	ANXA4	P97429	Aneksyna A4 (ang. <i>Annexin A4</i>)	+
73	ACLY	Q91V92	Syntaza cytrynianowa ATP (ang. <i>ATP-citrate synthase</i>)	+
74	TUBA1C	P68373	Łańcuch 1C tubuliny α (ang. <i>Tubulin α-1C chain</i>)	-
75	RAB14	Q91V41	Białko Rab-14 związane z białkami Ras (ang. <i>Ras-related protein Rab-14</i>)	+
76	HIST2H4A	P62806	Histon H4 (kodowany przez gen HIST2H4A; ang. <i>Histone H4</i>)	+
77	GNB1	P62874	Podjednostka β -1 białka G(I)/G(S)/G(T)	+

			wiążącego nukleotyd guaniny (ang. <i>Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit β-1</i>)	
78	UBA1	Q02053	Enzym 1 aktywujący modyfikator podobny do ubiquityny (ang. <i>Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1</i>)	+
79	THBS1	P35441	Trombospondyna-1 (ang. <i>Thrombospondin-1</i>)	-
80	RAN	P62827	Białko jądrowe Ran wiążące GTP (ang. <i>GTP-binding nuclear protein Ran</i>)	+
81	RAB5A	Q9CQD1	Białko Rab-5A związane z białkami Ras (ang. <i>Ras-related protein Rab-5A</i>)	+
82	PTGFRN	Q9WV91	Negatywny regulator receptora prostaglandyny F2 (ang. <i>Prostaglandin F2 receptor negative regulator</i>)	+
83	CCT5	P80316	Podjednostka ϵ białka 1 kompleksu T (ang. <i>T-complex protein 1 subunit ϵ</i>)	+
84	CCT3	P80318	Podjednostka γ białka 1 kompleksu T (ang. <i>T-complex protein 1 subunit γ</i>)	+
85	BSG	P18572	Basigina (ang. <i>Basigin</i>)	+
86	AHCY	P50247	Adenosylhomocysteinaza (ang. <i>Adenosylhomocysteinase</i>)	+
87	RAB5B	P61021	Białko Rab-5B związane z białkami Ras (ang. <i>Ras-related protein Rab-5B</i>)	-
88	RAB1A	P62821	Białko Rab-1A związane z białkami Ras (ang. <i>Ras-related protein Rab-1A</i>)	-
89	LAMP2	P17047	Glikoproteina błonowa 2 związana z lizosomem (ang. <i>Lysosome-associated membrane glycoprotein 2</i>)	+
90	ITGA6	Q61739	Integryna α -6 (ang. <i>Integrin α-6</i>)	+
91	HIST1H4B	P62806	Histon H4 (kodowany przez gen HIST1H4B; ang. <i>Histone H4</i>)	+
92	GSN	P13020	Żelzolina (ang. <i>Gelsolin</i>)	+
93	FN1	P11276	Fibronektyna (ang. <i>Fibronectin</i>)	+
94	YWHAH	P68510	Białko 14-3-3 η (ang. <i>14-3-3 protein η</i>)	+
95	TUBA1A	P68369	Łańcuch 1A tubuliny α (ang. <i>Tubulin α-1A chain</i>)	-
96	TKT	P40142	Transketolaza (ang. <i>Transketolase</i>)	+
97	TCP1	P11983	Podjednostka α białka 1 kompleksu T (ang. <i>T-complex protein 1 subunit α</i>)	+
98	STOM	P54116	Integralne białko błonowe pasma 7 erytrocytów (ang. <i>Erythrocyte band 7 integral membrane protein</i>)	+
99	SLC16A1	P53986	Transporter monokarboksylowy 1 (ang. <i>Monocarboxylate transporter 1</i>)	-
100	RAB8A	P55258	Białko Rab-8A związane z białkami Ras (ang. <i>Ras-related protein Rab-8A</i>)	-
Całkowita liczba białek zidentyfikowanych w preparatach MSC-EVs				82

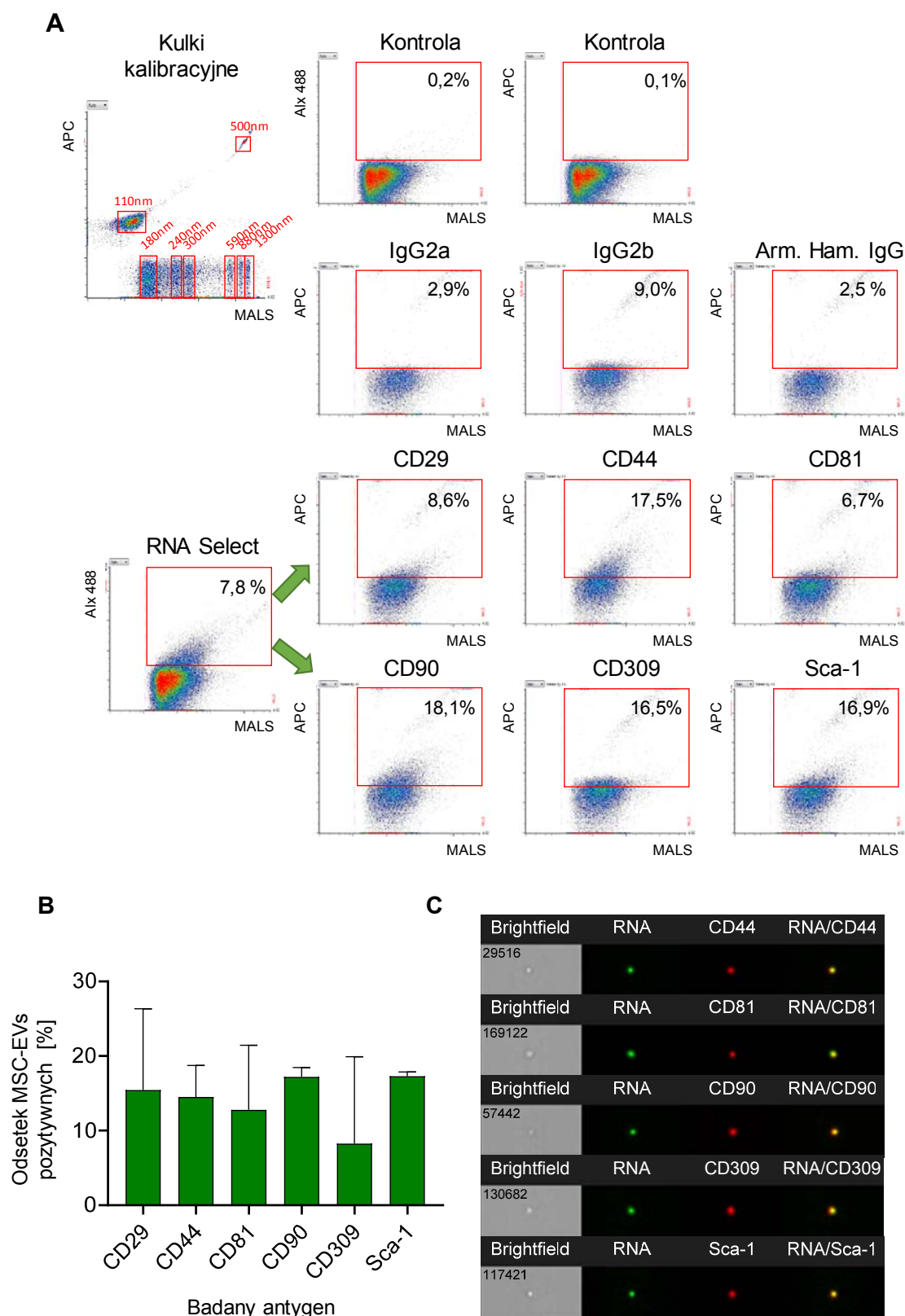
Przeprowadzone badania proteomiczne potwierdziły, że wyizolowane preparaty MSC-EVs zawierają białka typowe dla egzosomów, a zatem wykazują wzbogacenie we frakcję egzosomów.

W dalszym etapie, preparaty MSC-EVs poddano wieloparametrowej analizie cytometrycznej w celu określenia występowania na ich powierzchni wybranych markerów błonowych komórek MSCs - identyfikujących zatem w szczególności frakcję ektosomów (CD29, CD44, CD90, CD105, Sca-1). Zbadano również obecność wybranych ligandów dla aktywowanego śródbłonka naczyniowego (CD11a/CD18, CD15, CD49d, CD162) oraz receptora dla czynnika proangiogenego VEGF (CD309), co miało istotne znaczenie dla interpretacji badań przeprowadzonych w dalszej części pracy, a związanych z aktywnością proangiogenną badanych MSC-EVs.

Analizę cytometryczną przeprowadzono przy użyciu wysokorozdzielczego cytometru przepływowego (A50-Micro, Apogee Flow Systems) dedykowanego do analizy nanocząstek. Wykazano, że MSC-EVs posiadają na swojej powierzchni następujące antygeny powierzchniowe: CD29, CD44, CD81, CD90, CD309 oraz Sca-1 (Rycina 18) oraz nie potwierdzono występowania pozostałych badanych antygenów - w/w czterech molekuł będących ligandami dla antygenów występujących na powierzchni aktywowanego śródbłonka naczyniowego. Pomimo tego, że nie wykazano obecności w/w ligandów aktywowanego śródbłonka naczyniowego, nie można wykluczyć, że na powierzchni MSC-EVs występują inne cząsteczki biorące udział w oddziaływaniu z komórkami docelowymi, w tym ze śródbłonkiem naczyniowym. Na Rycinie 18 przedstawiono wyłącznie markery występujące na powierzchni cząsteczek MSC-EVs.

Wykorzystanie syntetycznych kulek kalibracyjnych pozwoliło potwierdzić średnią wielkość MSC-EVs zmierzoną przy użyciu systemu IZON qNano i wynoszącą ok. 180 nm. Ze względu na fakt, że niektóre izotypy przeciwciał mogą niespecyficznie wiązać się z antygenami, od wartości procentowej ekspresji danego antygeny odjęto wartości procentowe otrzymane dla odpowiedniej kontroli izotypowej skoniugowanej z fluorochromem, z którym skoniugowane było przeciwciało. Najwyższy odsetek MSC-EVs pozytywnych po względem badanego białka powierzchniowego obserwowano dla antygenów Sca-1 ($17,3 \pm 0,6\%$) oraz CD90 ($17,2 \pm 1,3\%$) (Rycina 18B).

W następnym kroku wykonano analizę MSC-EVs przy użyciu cytometru obrazowego ImageStreamX Mark II, która potwierdziła występowanie na powierzchni MSC-EVs badanych antygenów (Rycina 18C).



Rycina 18. Analiza wybranych antygenów charakterystycznych dla egzosomów oraz ektosomów pochodzących z komórek MSCs w preparatach MSC-EVs. A. Reprezentatywne dot-ploty z analizy ekspresji wybranych antygenów na powierzchni MSC-EVs z zastosowaniem wysokorozdzielczej cytometrii przepływowej dedykowanej do analizy małych obiektów. Na wykresie kontrolnym przedstawiono rozkład wielkości cząsteczek uzyskany przy zastosowaniu mieszaniny syntetycznych kulek kalibracyjnych - polistyrenowych (110 nm, 500 nm) i

silikonowych (180 nm, 240 nm, 300 nm, 590 nm, 880 nm, 1300 nm). Wykresy przedstawiają zależność intensywności fluorescencji zbieranej w danym kanale fluorescencyjnym (Alx 488 lub APC) i rozproszenia światła MALS (ang. *middle angle light scatter*), którego wartość koreluje z wielkością badanych cząstek. Do analizy wzięto wyłącznie integralne pęcherzyki zawierające RNA - identyfikowane dzięki barwieniu odczynnikami RNASelect. Odsetek obiektów pozytywnych pod względem ekspresji danego antygenu powierzchniowego mierzono w odniesieniu do próbek niebarwionych (kontrola) zbieranych w kanałach Alx 488 oraz APC. Dla każdego przeciwciała wykonano odpowiednie kontrole izotypowe. **B.** Ocena ilościowa ekspresji wybranych antygenów na powierzchni MSC-EVs. Od wartości procentowej ekspresji danego antygenu odejmowano wartość procentową otrzymaną dla odpowiedniej kontroli izotypowej, a następnie przedstawiono na wykresie, jako wartości średnie $\pm$ SD. N=3. **C.** Ocena jakościowa ekspresji wybranych antygenów na powierzchni MSC-EVs przenoszących RNA (wybarwionych barwnikiem SYTO RNASelect, zielony) z zastosowaniem cytometru obrazowego Image Stream X Mark II (Merck).

Podsumowując, przeprowadzone badania potwierdziły wzbogacenie badanych preparatów MSC-EVs stosowanych dalej w niniejszej pracy – zarówno we frakcję ektosomów, jak i egzosomów, potwierdzając ich heterogenność subpopulacyjną, jak również skuteczność samych metod ich izolacji, zastosowanych w pracy.

4.5. Charakterystyka bioaktywnej zawartości molekularnej przenoszonej przez MSC-EVs

Jak wspomniano we wstępie pracy, wyniki badań światowych wskazują, że pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą przenosić bioaktywne cząsteczki takie jak: białka, receptory, mRNA, miRNA oraz lipidy, dzięki czemu mogą odgrywać istotną rolę w komunikacji międzykomórkowej (105,214). W związku z tym, w celu określenia biologicznej zawartości przenoszonej przez MSC-EVs, w dalszej części niniejszej pracy wykonano pogłębioną globalną analizę proteomiczną oraz analizę obecności cząsteczek miRNA oraz wybranych transkryptów mRNA w badanych preparatach MSC-EVs.

4.5.1. Globalna analiza proteomiczna MSC-EVs

Globalną analizę proteomiczną komórek MSCs oraz MSC-EVs wykonano metodą chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas (ang. *liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS), w celu identyfikacji jak największej liczby białek obecnych przede wszystkim w preparatach MSC-EVs, jak również w komórkach wyjściowych MSCs.

W przypadku próbek komórek MSCs, zidentyfikowano w sumie **6487** białek, natomiast w przypadku preparatów MSC-EVs - **2242** białka. Liczby białek zidentyfikowane w poszczególnych powtórzeniach biologicznych (N=3) komórek MSCs oraz próbek MSC-EVs były zbliżone. W dalszej analizie, w przynajmniej dwóch (na trzy) analizowanych próbkach, na podstawie dwóch lub więcej unikalnych peptydów, zidentyfikowano **3920** białek wspólnych w komórkach MSCs oraz **818** białek wspólnych w próbkach MSC-EVs. Co więcej, w komórkach MSCs zidentyfikowano **2893** białka różnicowe, czyli takie, które nie występowały (lub były poniżej progu detekcji metody) w

próbkach MSC-EVs. Natomiast w próbkach MSC-EVs zidentyfikowano **135** białek (wymienionych w *Załączniku, p. 8.1. Tabele, Tabela V*), które z kolei były poniżej poziomu detekcji w komórkach MSCs, co świadczy o ich szczególnym wzbogaceniu w badanych pęcherzykach (Tabela 26).

Tabela 26. Wyniki globalnej analizy proteomicznej komórek MSCs oraz MSC-EVs z wyszczególnieniem danych dotyczących grup eksperymentalnych i poszczególnych powtórzeń biologicznych.

Nazwa grupy/ Nr powt.		Suma wszystkich zidentyfikowanych białek w grupie	Liczba zidentyfikowanych białek w grupie	Liczba białek zidentyfikowanych na podstawie $2 \leq$ peptydów	Liczba białek wspólnych w danej grupie, tzn.: zidentyfikowanych w przynajmniej 2 z 3 próbek na podstawie $2 \leq$ <u>unikalnych</u> peptydów	Liczba białek różnicowych (występujących głównie w badanej grupie)
MSCs	1	6487	5577	4248	3920	2893
	2		5702	4290		
	3		5314	3921		
MSC-EVs	1	2242	1776	1047	818	135
	2		1552	687		
	3		1570	879		

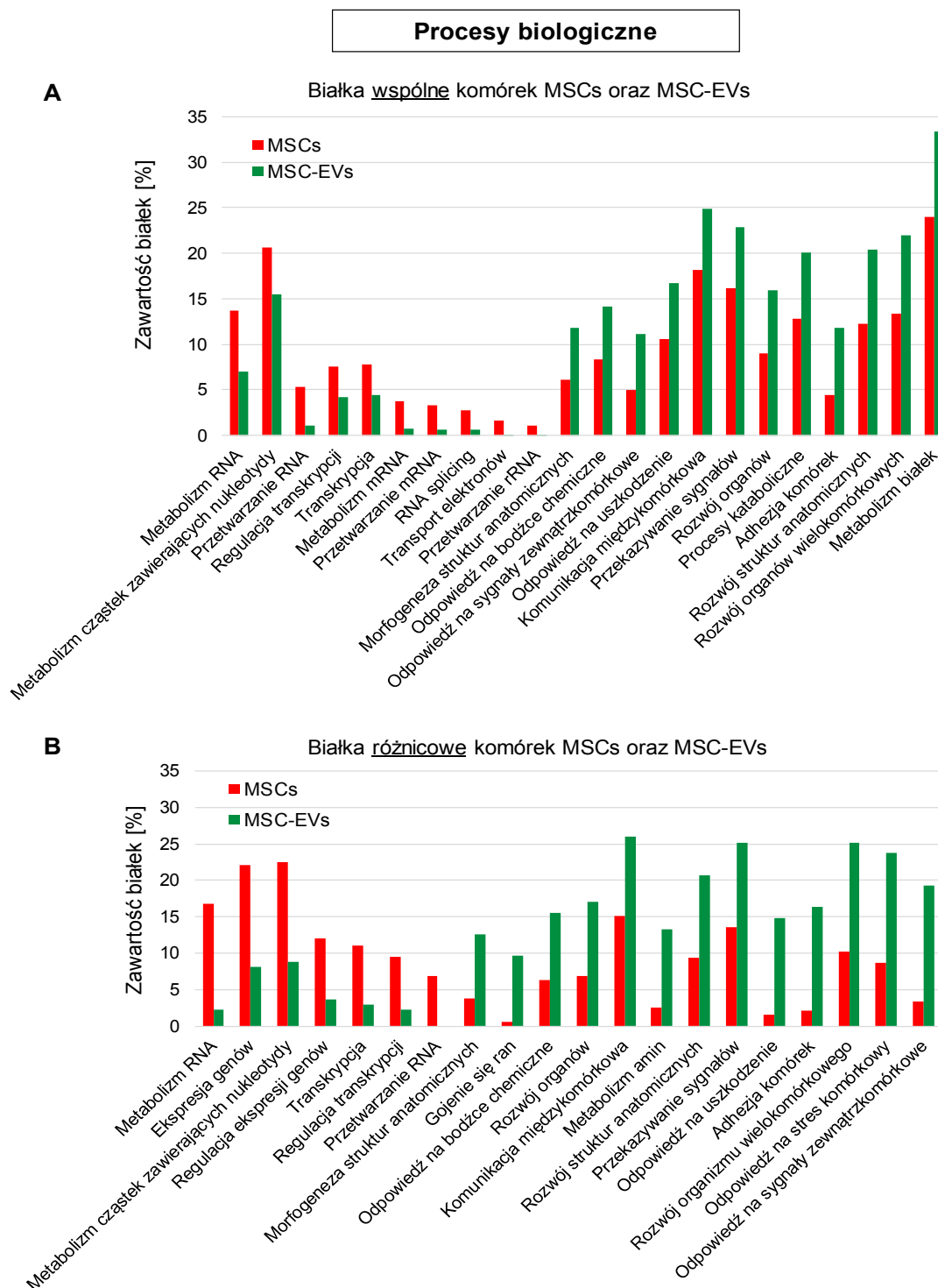
Grupy białek zidentyfikowane w większości próbek (przynajmniej w dwóch próbkach na trzy) i w oparciu o kilka unikalnych peptydów (≥ 2) uwzględniano w kolejnych analizach.

W dalszym etapie, przy użyciu aplikacji Gene Ontology (GO) - służącej do globalnych analiz bioinformatycznych danych proteomicznych, **obie pule wspólnych białek wykrytych w komórkach MSCs oraz w preparatach MSC-EVs** porównano między sobą. Aplikacja GO umożliwia funkcjonalny podział na następujące trzy grupy białek zaangażowanych w: **procesy biologiczne**, pełniących **funkcje molekularne** oraz będących **składnikami komórkowymi**.

W pierwszej kolejności, skupiono się na **białkach wspólnych** w danej grupie, które są zaangażowane w **procesy biologiczne**. Wśród najbardziej istotnych grup białek zidentyfikowanych zarówno w komórkach MSCs, jak i próbkach MSC-EVs należą białka uczestniczące i odpowiedzialne za: **komunikację międzykomórkową i przekazywanie sygnałów, rozwój organizmów wielokomórkowych i struktur anatomicznych, odpowiedź na bodźce chemiczne, metabolizm białek oraz odpowiedź na uszkodzenie** (Rycina 19A). Co interesujące, odsetek białek należących do wymienionych grup był wyższy w preparatach MSC-EVs niż w samych komórkach MSCs. Z kolei komórki MSCs

wykazują wzbogacenie w białka zaangażowane i odpowiedzialne za: transkrypcję i jej regulację, metabolizm RNA, mRNA i cząstek zawierających nukleotydy (Rycina 19A).

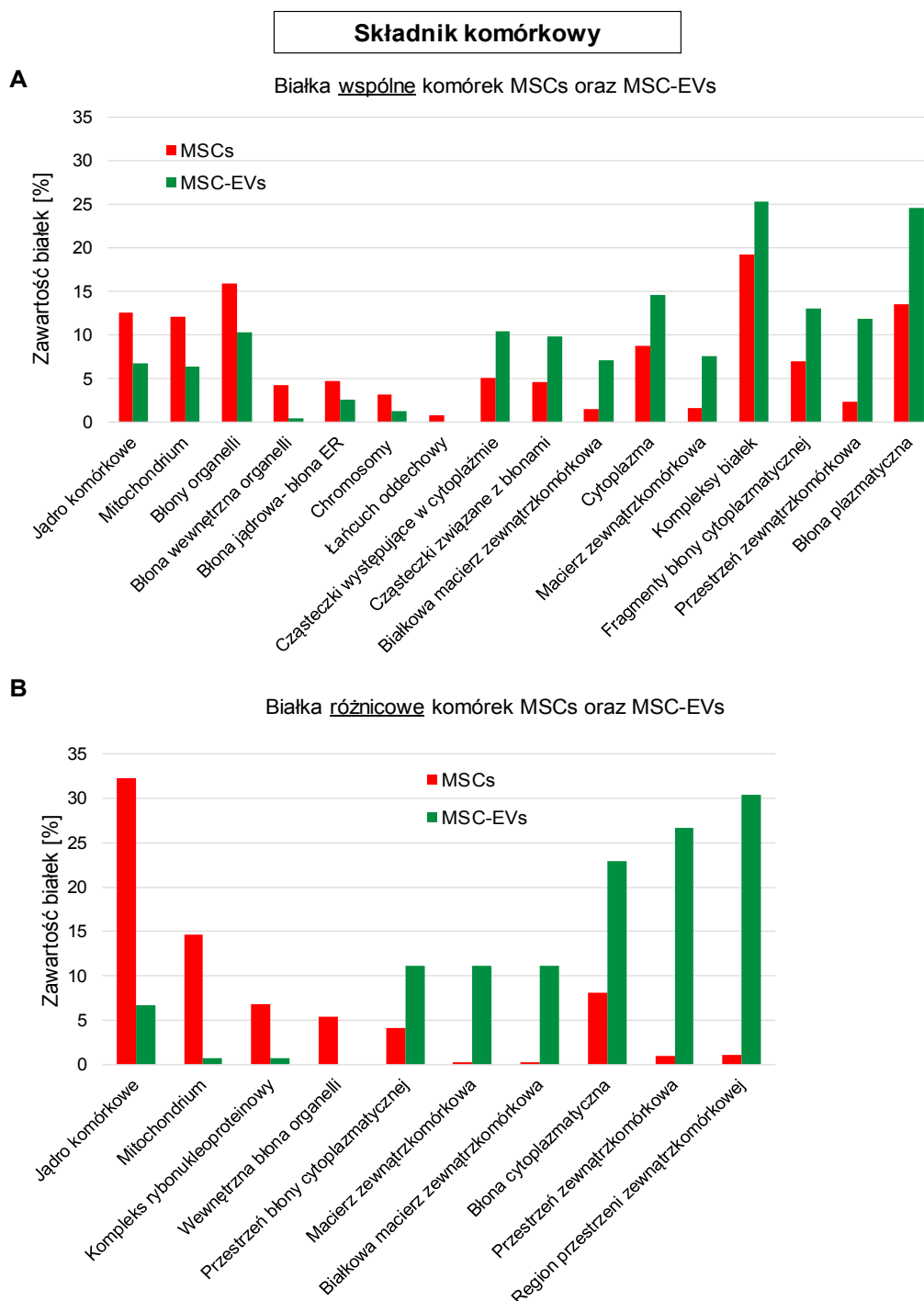
Analogiczną analizę wykonano dla białek **różnicowych**, czyli takich które zidentyfikowano w próbkach tylko jednej grupy (tj. tylko w komórkach MSCs lub tylko w MSC-EVs). Wykazano, że białka różnicowe zidentyfikowane w próbkach MSC-EVs, a zatem szczególnie w nich zagęszczone, mogą być zaangażowane w podobne procesy biologiczne, jak opisano w przypadku białek wspólnych, tj. w **komunikację międzykomórkową i przekazywanie sygnałów, adhezję komórek, rozwój organizmów wielokomórkowych i rozwój struktur anatomicznych, a także w odpowiedź na stres komórkowy oraz gojenie się ran/ uszkodzeń** (Rycina 19B). Co istotne, MSC-EVs zawierają wyższy odsetek białek wspólnych i różnicowych zaangażowanych w **adhezję komórkową**, niż komórki MSCs (11,9% vs. 4,4% w przypadku białek wspólnych oraz 16,3% vs. 2,4% w przypadku białek różnicowych), co może korzystanie wpływać na oddziaływanie MSC-EVs z komórkami akceptorowymi (Rycina 19A, B; *Załącznik, p. 8.1. Tabele, Tabela I*). Dodatkowo, wzbogacenie MSC-EVs w **białka zaangażowane w rozwój struktur anatomicznych i organizmu wielokomórkowego** (wynoszący powyżej 20% białek wszystkich białek GO należących do tej grupy) może świadczyć o potencjalnym zaangażowaniu tych cząsteczek w procesy regeneracji tkanek i narządów, w tym proces angiogenezy i kardiomiogenezy, co badano w tej pracy. W związku z tym, uzasadnione było w mojej ocenie, przeprowadzenie dalszej szczegółowej analizy bioinformatycznej białek występujących w MSC-EVs, co wykonano w kolejnej części pracy.



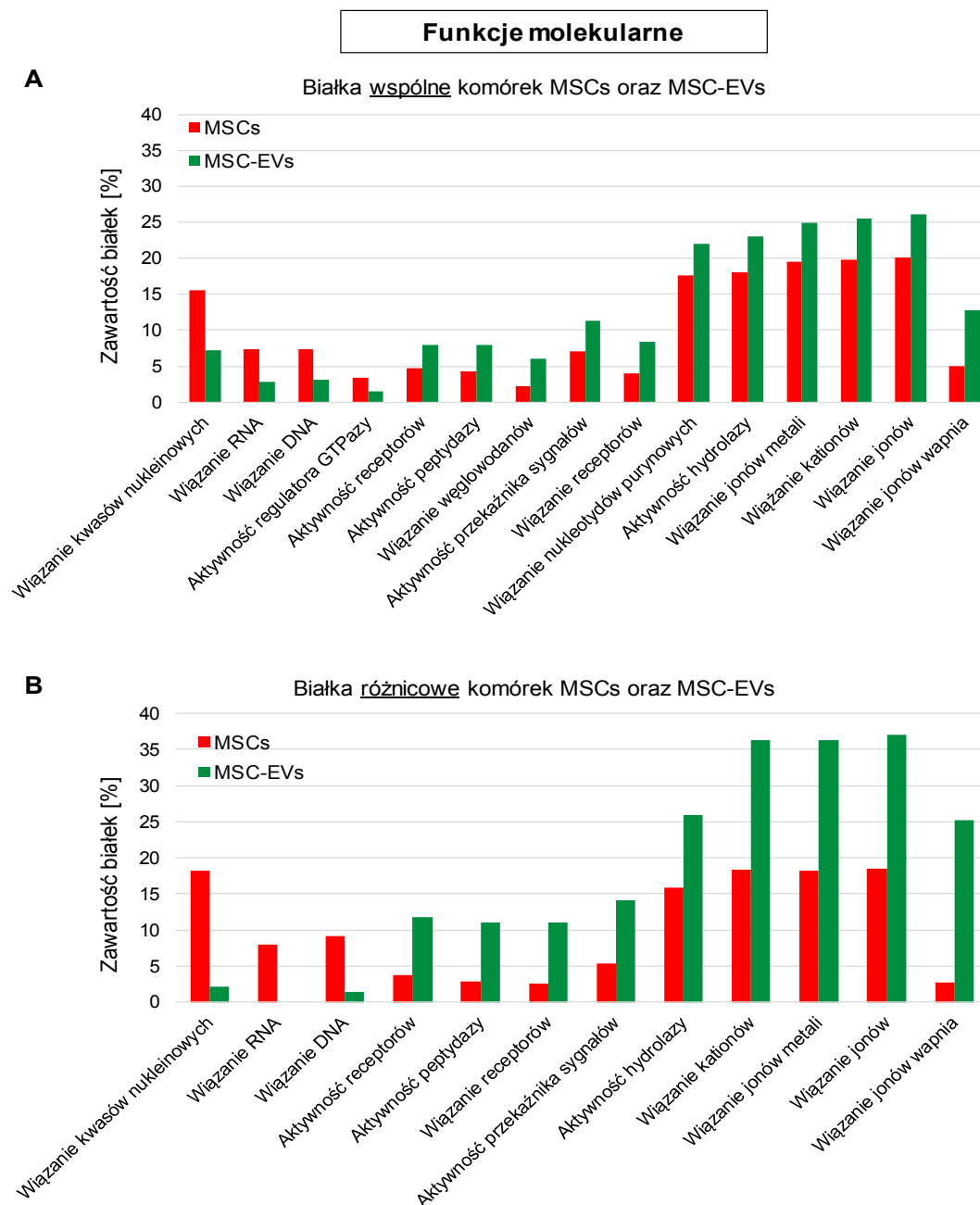
Rycina 19. Analiza białek zaangażowanych w wybrane procesy biologiczne w komórkach MSCs oraz MSC-EVs wykonana przy pomocy aplikacji Gene Ontology. A. Porównanie zawartości procentowej białek wspólnych dla danej grupy. B. Porównanie zawartości procentowej białek różnicowych - tj. białek, które zostały zidentyfikowane we próbkach jednej grupy i w żadnej próbce drugiej grupy. Do analizy wykorzystano wyłącznie białka zidentyfikowane w przynajmniej dwóch z trzech próbek na podstawie 2 lub większej liczby unikalnych peptydów. Na osi X przedstawiono poszczególne kategorie procesów biologicznych, natomiast na osi Y- procent białek zaklasyfikowanych do danej kategorii GO zidentyfikowanych w analizowanym zestawie danych.

W dalszym etapie wykazano, że 24,6% białek wspólnych zidentyfikowanych w preparatach MSC-EVs przyporządkowanych według **składnika komórkowego** stanowią białka związane z błoną komórkową, 7,6% białek stanowią białka macierzy pozakomórkowej, natomiast 14,6% białek stanowią białka cytoplazmatyczne (Rycina 20A). Biorąc pod uwagę białka różnicowe obecne w MSC-EVs wykazano, że 23,0% tych białek stanowią białka związane z błoną cytoplazmatyczną, natomiast 30,4% białek stanowią białka macierzy pozakomórkowej (Rycina 20B). W przypadku białek wspólnych w komórkach MSCs dominują białka występujące w przestrzeni jądra komórkowego, błonach organeli wewnątrzkomórkowych oraz białka mitochondrialne, natomiast w przypadku białek różnicowych znaczny odsetek stanowią białka jądra komórkowego i mitochondrium (Rycina 20A, B). Białka różnicowe zidentyfikowane w komórkach MSCs oraz preparatach MSC-EVs potwierdzają występowanie w otrzymanych preparatach EVs, jednoznacznie odróżniając je od komórek MSCs na podstawie składu białkowego.

Spośród białek wspólnych występujących w MSC-EVs, 24,9% zaklasyfikowano zgodnie z **funkcją molekularną**, jako białka wiążące jony, w tym także konkretne kationy oraz jony metali. Analogiczne wyniki otrzymano dla białek różnicowych występujących w MSC-EVs, w których 37,0% zidentyfikowanych białek wykazuje zdolność do wiązania jonów, w tym jonów metali i kationów (Rycina 21A, B). Dodatkowo, wśród białek wspólnych oraz różnicowych zidentyfikowanych w preparatach MSC-EVs, występują białka wiążące receptory, co może wpływać na ich zdolność do wiązania się do komórek docelowych, a tym samym wpływać na funkcje tych komórek, co było przedmiotem badań opisanych w dalszej części pracy.



Rycina 20. Analiza białek zidentyfikowanych, jako składnik komórkowy w komórkach MSCs oraz MSC-EVs wykonana przy pomocy aplikacji Gene Ontology (GO). A. Porównanie zawartości procentowej białek wspólnych dla danej grupy. B. Porównanie zawartości procentowej białek różnicowych - białek, które zostały zidentyfikowane we próbkach jednej grupy i w żadnej próbce drugiej grupy. Do analizy wykorzystano wyłącznie białka zidentyfikowane w przynajmniej dwóch z trzech próbek na podstawie 2 lub większej liczby unikalnych peptydów. Na osi X przedstawiono poszczególne kategorie składnika komórkowego, natomiast na osi Y- procent białek zaklasyfikowanych do danej kategorii GO zidentyfikowanych w analizowanym zestawie danych.

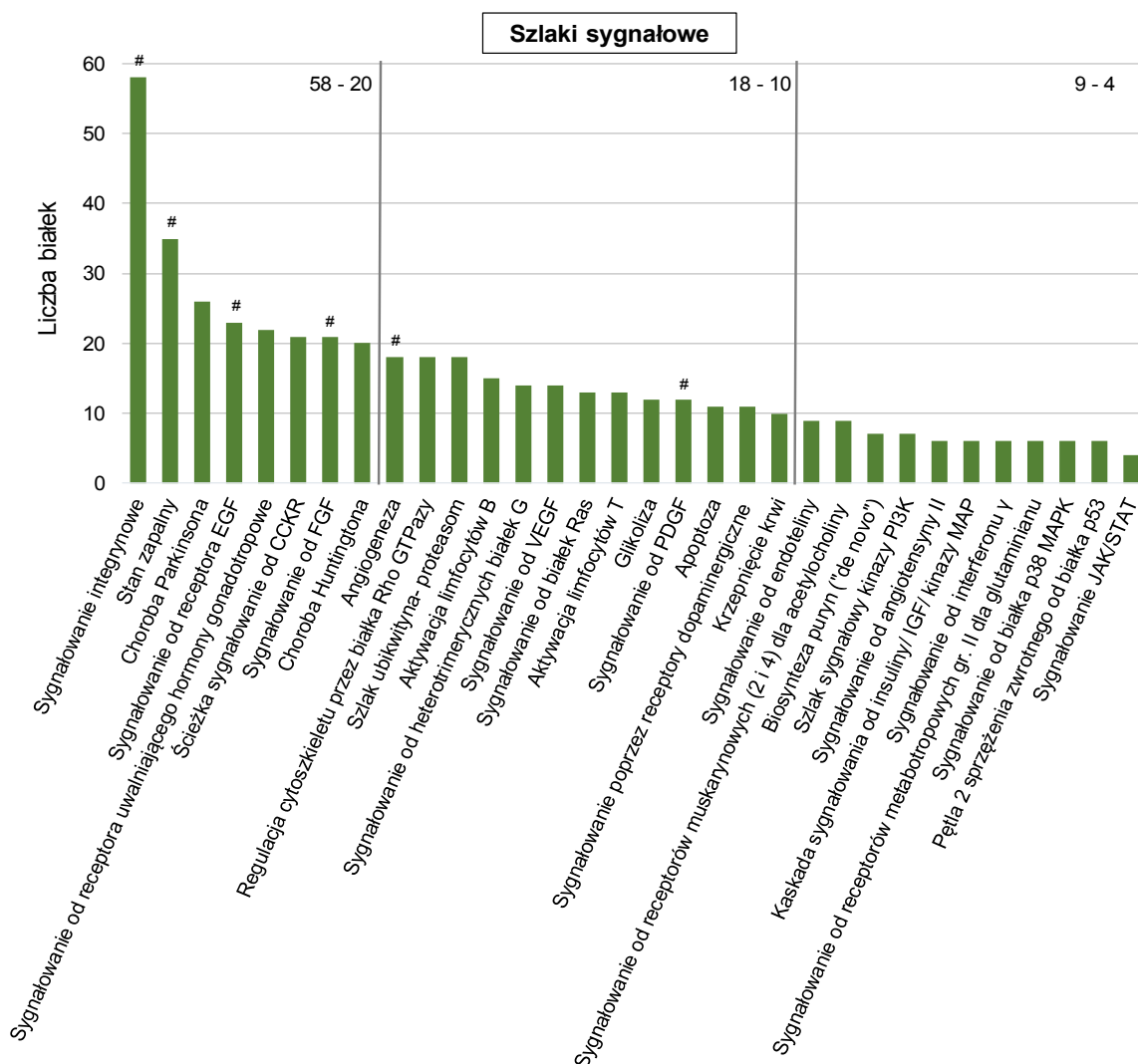


Rycina 21. Analiza białek zaangażowanych w wybrane funkcje molekularne. Białka zidentyfikowane w komórkach MSCs oraz MSC-EVs. Analiza wykonana przy pomocy aplikacji Gene Ontology (GO). **A.** Porównanie zawartości procentowej białek wspólnych dla danej grupy. **B.** Porównanie zawartości procentowej białek różnicowych- białek, które zostały zidentyfikowane w próbkach jednej grupy i w żadnej próbce drugiej grupy. Do analizy wykorzystano wyłącznie białka zidentyfikowane we wszystkich analizowanych próbkach (powtórzeniach biologicznych) lub w przynajmniej dwóch z trzech próbek na podstawie 2 lub większej liczby unikalnych peptydów. Na osi X przedstawiono poszczególne kategorie funkcji molekularnych, natomiast na osi Y- procent białek zaklasyfikowanych do danej kategorii GO zidentyfikowanych w analizowanym zestawie danych.

Podsumowując, powyższa analiza porównawcza danych proteomicznych próbek komórek MSCs oraz preparatów MSC-EVs wykazała, że MSC-EVs mogą być zaangażowane w regenerację uszkodzonych tkanek ze względu na wzbogacenie w następujące grupy białek zaangażowanych w: **odpowiedź na uszkodzenie i bodźce chemiczne, gojenie się ran/ uszkodzeń, rozwój struktur anatomicznych i organów, przekazywanie sygnałów oraz komunikację międzykomórkową**. W celu potwierdzenia postawionej hipotezy, wykonano szczegółową analizę bioinformatyczną białek zidentyfikowanych w MSC-EVs (w przynajmniej dwóch z trzech próbek na podstawie dwóch lub więcej unikalnych peptydów dla danego białka) przy użyciu aplikacji GO z klasyfikacją białek według modułu *Panther Pathways*.

Przeprowadzona analiza bioinformatyczna wykazała m.in., że białka zidentyfikowane w MSC-EVs mogą być zaangażowane w szereg szlaków, takich jak: **sygnałowanie od receptora EGF oraz FGF** (ang. *EGF receptor signaling*; *FGF signaling*), **angiogenezę** (ang. *angiogenesis*), **sygnałowanie od czynników VEGF i PDGF** (ang. *VEGF signaling*, *PDGF signaling*), jak również w sygnałowanie **integrynowe** (ang. *integrin signalling*) i **stan zapalny** (ang. *inflammation*) (Rycina 22). Wszystkie wymienione szlaki są związane pośrednio i bezpośrednio z procesami angiogenezy, co ma istotne znaczenie w regeneracji, szczególnie tkanek uszkodzonych w wyniku niedotlenienia. Doniesienia literaturowe potwierdzają, że szlaki sygnałowe od receptora dla EGF, FGF oraz PDGF są zaangażowane w proces angiogenezy (190,215). MSC-EVs mogą przenosić molekuly zaangażowane w sygnałowanie od heterotrimerycznych białek G (Rycina 22), natomiast białka G uczestniczą w przekaznictwie sygnałów od receptorów błonowych z nimi związanych (216). Dodatkowo, MSC-EVs wykazują wzbogacenie w białka zaangażowane w inne szlaki sygnałowania, takie jak m.in.: sygnałowanie pochodzące od białek Ras, poprzez receptory dopaminergiczne, receptory muskarynowe, jak również poprzez kinazy MAP (Rycina 22).

Wzbogacenie MSC-EVs w białka zaangażowane w liczne w/w szlaki sygnałowania, może świadczyć o potencjale regeneracyjnym mediowanym przez te nanocząstki, co było przedmiotem badań opisanych w dalszej części pracy.



Rycina 22. Analiza białek zidentyfikowanych w MSC-EVs przy użyciu aplikacji GO z modulem Panther Pathways. Analiza wykazała zaangażowanie zidentyfikowanych białek w szlaki związane z angiogenezą, które oznaczono symbolem „#”. Do analizy wykorzystano białka zidentyfikowane w przynajmniej dwóch z trzech próbek na podstawie 2 lub większej liczby unikalnych peptydów. Dla analizy przyjęto, że współczynnik FDR (*ang. False discovery rate*) wynosił poniżej 5%. Na osi X przedstawiono poszczególne szlaki sygnałowe wyodrębnione przez GO, natomiast na osi Y- liczbę białek zaklasyfikowanych do danej kategorii GO w analizowanym zestawie danych.

Wykorzystana aplikacja GO umożliwia dokładną identyfikację listy białek przyporządkowanych do danej grupy funkcjonalnej bądź strukturalnej GO. W związku z tym, w kolejnym etapie sprawdzono czy występują powiązania pomiędzy białkami zaangażowanymi w **adhezję komórek**, a także czy powiązania takie występują pomiędzy białkami różnych grup GO, w tym białkami zaangażowanymi w **adhezję komórek, gojenie się ran/ uszkodzeń oraz rozwój naczyń krwionośnych**. W tym celu do analizy zastosowano aplikację STRING (<https://string-db.org/>).

Przeprowadzona analiza wykazała, że pomiędzy białkami zidentyfikowanymi w MSC-EVs, zaangażowanymi w **adhezję komórek** (wymienionymi w *Załączniku, p. 8.1.*

Tabele, Tabela I), istnieje wiele udokumentowanych oraz przewidywanych interakcji, natomiast nadrzędnym białkiem będącym pierwszym ogniwem interakcji jest **antygen CD44** - będący transbłonową glikoproteiną (217) (Rycina 23). Antygen ten jest nie tylko markerem komórek MSCs, ale może także pośredniczyć w ich oddziaływaniu ze śródbłonkiem naczyń przez wiązanie się tych komórek do kwasu hialuronowego na powierzchni komórek śródbłonka (218). W centrum interaktomu zidentyfikowane zostały również m.in. β1 integryna (Itgb1), α4 integryna (Itga4), α5 integryna (Itga5), αL integryna (Itgal), fibronektyna (Fn1), które mogą uczestniczyć m.in. w wiązaniu się hematopoetycznych KM do białek zrębu niszy (219).

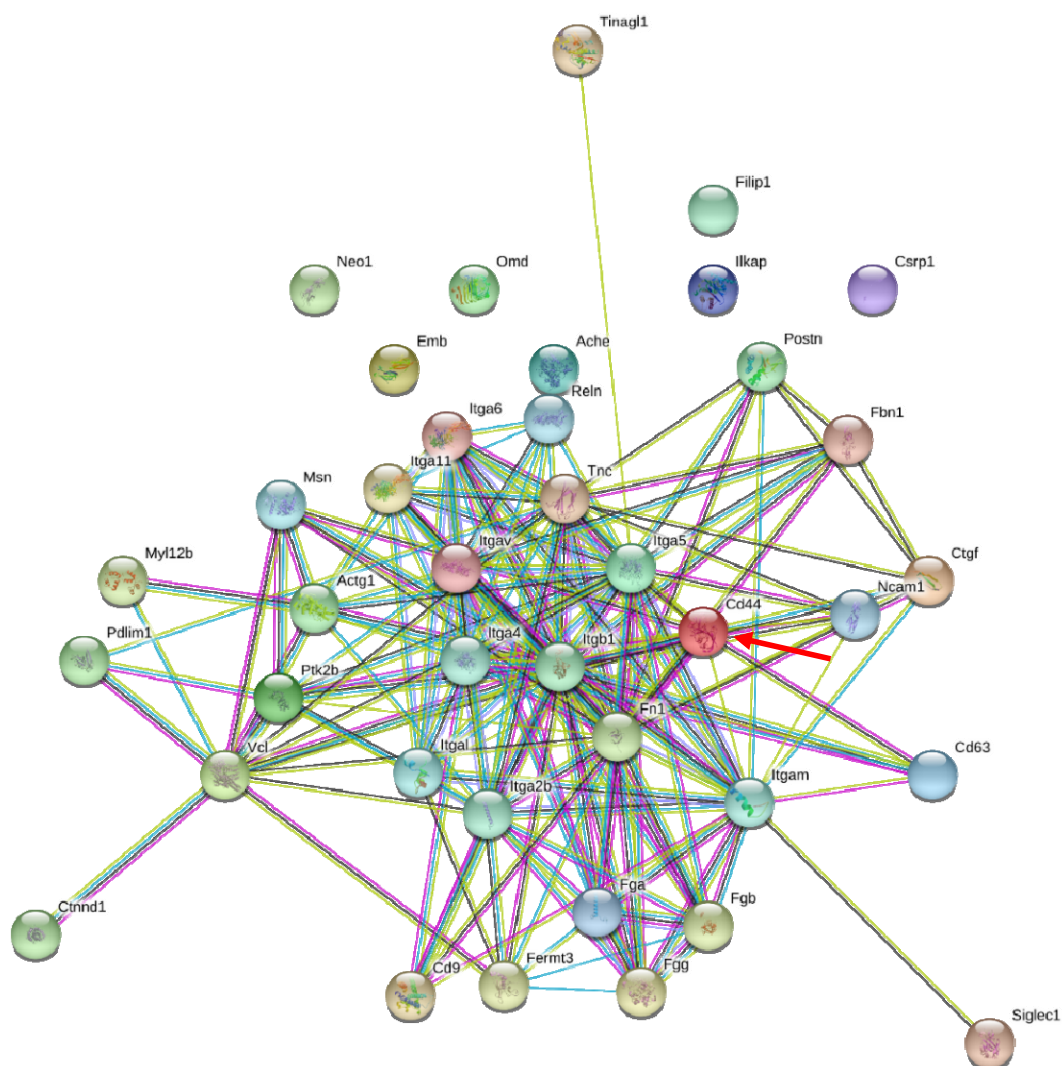
W związku z tym, że pomiędzy białkami zaangażowanymi w adhezję komórek, zidentyfikowanymi w MSC-EVs, istnieje wiele interakcji, w kolejnym etapie prześledzono powiązania pomiędzy białkami zaangażowanymi w **adhezję komórek, gojenie się ran/ uszkodzeń oraz rozwój naczyń krwionośnych**.

Przeprowadzona analiza wykazała, że nadrzędnym białkiem będącym pierwszym ogniwem interakcji zidentyfikowanym dzięki analizie STRING, jest **kinaza MAPK14** (Rycina 24). W centrum utworzonego interaktomu wyraźnie wyróżniały się dwie grupy białek: i) związana z adhezją komórek – wśród których występuje m.in. β1 integryna (Itgb1), α4 integryna (Itga4), fibronektyna (Fn1), oraz ii) związana ze szlakami sygnałowania oraz adhezją komórek – wśród których występuje m.in. kinaza białkowa 14 aktywowana mitogenem (Mapk14), kinaza białkowa 1 aktywowana mitogenem (Mapk1), winkulina (Vcl), białkowa kinaza tyrozynowa 2β (Ptk2b), antygen CD44 oraz aneksyna A5 (Anxa5).

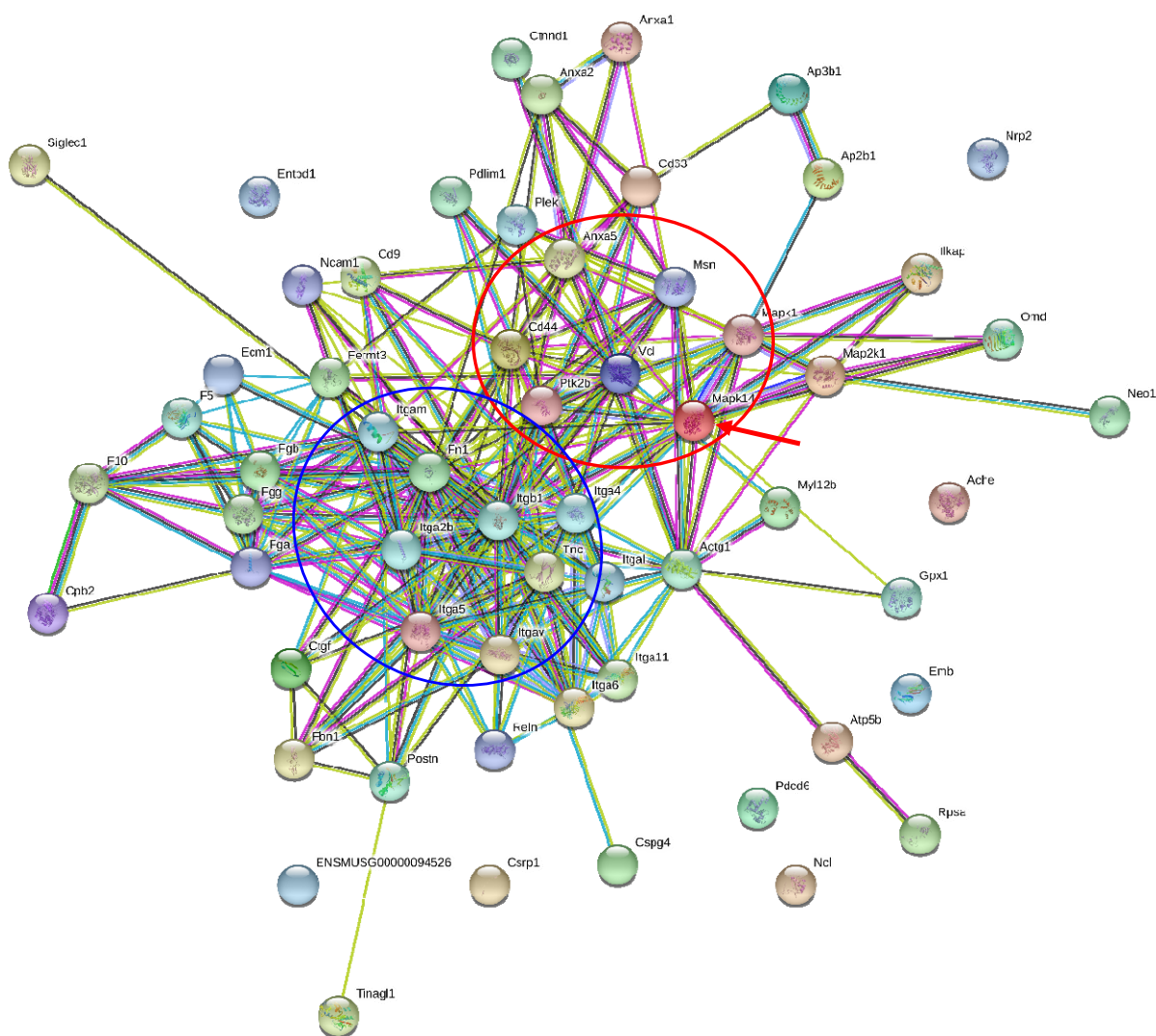
Przeprowadzona analiza wykazała wiele udokumentowanych oraz przewidywanych oddziaływań pomiędzy w/w białkami, co wzmacnia wcześniej postawioną hipotezę zakładającą, że MSC-EVs mogą modulować procesy regeneracji uszkodzonych tkanek poprzez zdolność do adhezji i oddziaływania z komórkami docelowymi.

Nadrzędnym celem badawczym realizowanym w ramach niniejszej pracy doktorskiej było uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy MSC-EVs przenoszą ładunek biologiczny, który może stymulować regenerację uszkodzonych tkanek, a w szczególności procesy angiogenezy i kardiomiogenezy. W związku z tym, białka zidentyfikowane w preparatach MSC-EVs, analizowano przy użyciu aplikacji GO pod kątem ich potencjalnej możliwości promowania procesów regeneracji tkanek.

W *Załączniku, p. 8.1. Tabele, Tabela I* wymieniono wszystkie białka, które mogą pośredniczyć w **adhezji komórek**, a w przypadku MSC-EVs w ich oddziaływaniach z komórkami docelowymi, natomiast w *Załączniku, p. 8.1. Tabele, Tabela II i III* wymieniono odpowiednio białka, które mogą być zaangażowane w **proces angiogenezy i tworzenia nowych naczyń krwionośnych** zaklasyfikowanych do tych kategorii procesów biologicznych przy użyciu aplikacji GO. Natomiast *Załącznik, p. 8.1. Tabele, Tabela IV* zawiera białka związane z **proliferacją komórek**.



Rycina 23. Sieć interakcji pomiędzy białkami zaangażowanymi w adhezję komórek zidentyfikowanymi w MSC-EVs. Czerwoną strzałką zaznaczono pierwsze ogniwo interakcji - białko CD44. Liczba linii łączących poszczególne białka koreluje z liczbą interakcji: im większa liczba linii, tym więcej udokumentowanych/ przewidywanych powiązań pomiędzy poszczególnymi białkami. Analizę wykonano przy użyciu aplikacji STRING. Rozwinięcie skrótów białek przedstawionych na interaktomie zamieszczono w *Załączniku, p. 8.2. Rozwinięcia skrótów w opisach do Rycin.*



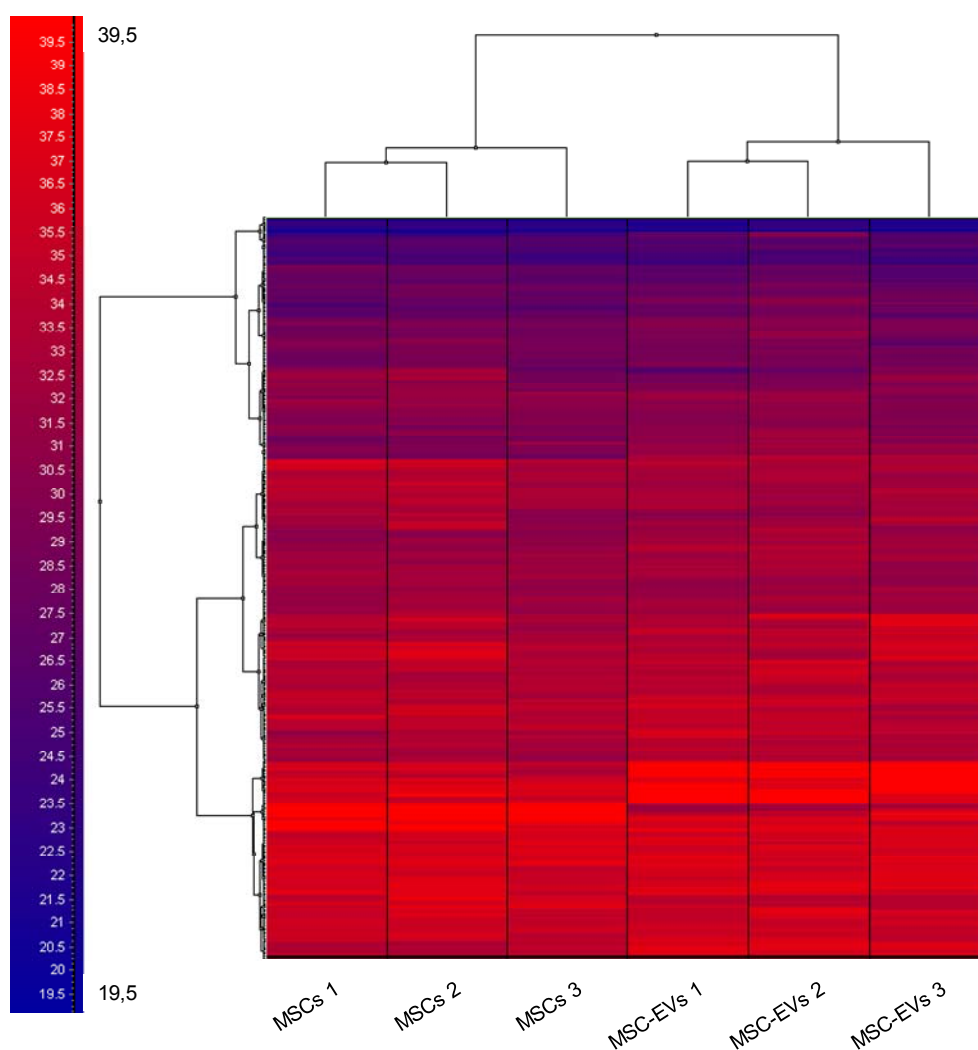
Rycina 24. Sieć interakcji pomiędzy białkami zaangażowanymi w adhezję komórek, rozwój naczyń krwionośnych oraz gojenie się ran/ uszkodzeń zidentyfikowanymi w MSC-EVs. Czerwona strzałka wskazuje pierwsze ogniwo interakcji - kinazę MAPK14. Pętlą niebieską zaznaczoną grupę białek zaangażowanych w adhezję komórek, pomiędzy którymi istnieją liczne powiązania, natomiast pętla czerwona – białka zaangażowane w szlaki sygnałowe oraz adhezję komórek o dużej liczbie powiązań pomiędzy poszczególnymi białkami. Analizę wykonano przy użyciu aplikacji STRING. Rozwinięcie skrótów białek przedstawionych na interaktomie zamieszczono w *Załączniku, p. 8.2. Rozwinięcia skrótów w opisach do Rycin.*

Podsumowując, przeprowadzone analizy składu białkowego potwierdzają, że MSC-EVs mogą przenosić liczne białka, pomiędzy którymi istnieje rozbudowana sieć oddziaływań, które mogą promować regenerację niedotlenionych tkanek poprzez oddziaływanie z komórkami docelowymi oraz stymulację procesu tworzenia nowych naczyń krwionośnych.

4.5.2. Analiza transkryptów miRNA i mRNA w komórkach MSCs oraz preparatach MSC-EVs

W kolejnym etapie badań, przeprowadzono poszerzoną analizę transkryptów miRNA występujących zarówno w komórkach MSCs oraz MSC-EVs, przy użyciu komercyjnie dostępnych paneli identyfikujących specyficznie kilkaset mysich i szczurzych wariantów miRNA (*microRNA Ready-to-Use PCR 384-well plates; Mouse & Rat Panel I+II, V3.M; Exiqon*).

Analiza wyników przedstawionych na wykresie typu *heat map* wykazała podobieństwo pomiędzy poszczególnymi próbkami komórek MSCs, jak również pomiędzy próbkami MSC-EVs (Rycina 25). Co istotniejsze, na wykresie widoczne jest także podobieństwo co do składu miRNA pomiędzy dwoma analizowanymi grupami – tj. komórkami MSCs oraz preparatami MSC-EVs.



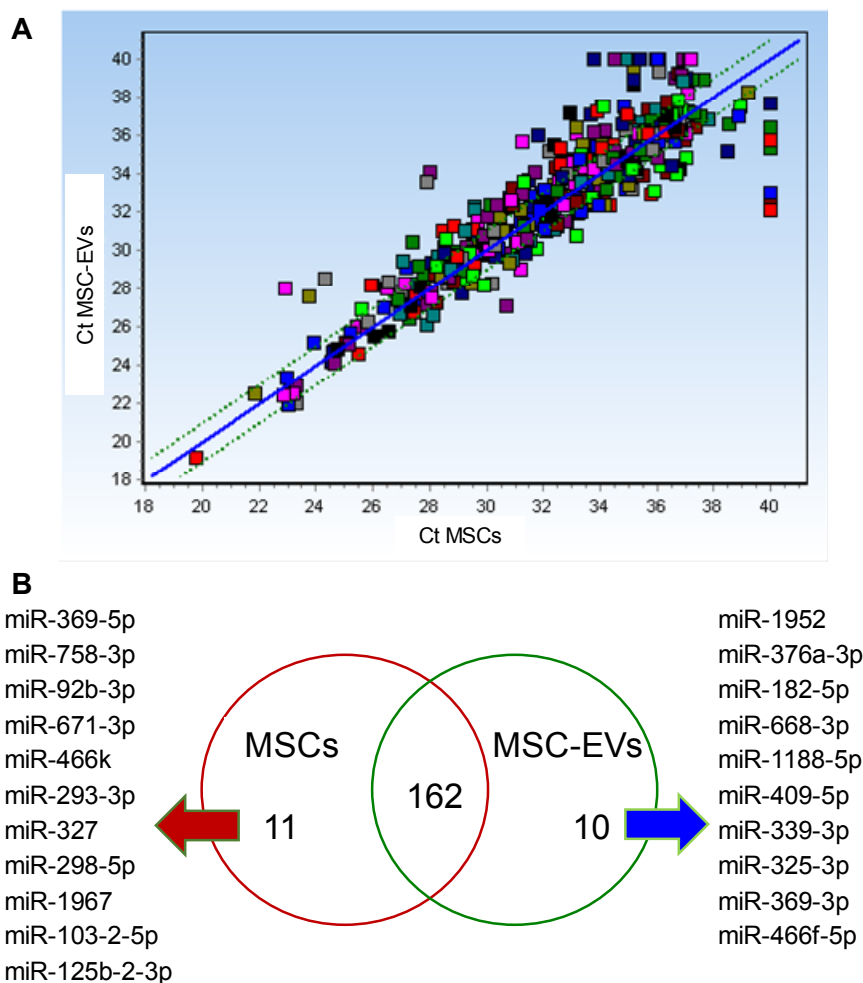
Rycina 25. Globalna analiza transkryptów miRNA w komórkach MSCs oraz MSC-EVs. Różnice kolorystyczne na *heat map* na określonych wysokościach odzwierciedlają różnice w transkryptach miRNA komórek rodzielskich MSCs oraz MSC-EVs. Analizie poddano 3 próbki komórek MSCs oraz 3 próbki preparatów MSC-EVs.

Cząsteczki miRNA, które ulegały amplifikacji w komórkach MSCs oraz MSC-EVs, przedstawiono na wykresie rozproszenia (Rycina 26A), na którym poszczególne punkty odpowiadające określonym miRNA, odnoszą się do numeru cyklu (Ct), w którym produkty ulegają amplifikacji w próbkach MSC-EVs (oś Y) oraz komórkach rodzicielskich (oś X) w czasie reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Rozkład punktów tworzy w większości zależność liniową, co świadczy o podobnej zawartości większości badanych miRNA zarówno w komórkach MSCs, jak i MSC-EVs. W analizie zidentyfikowano 162 cząsteczki miRNA wspólnie występujące w komórkach MSCs oraz w MSC-EVs (Rycina 26B), co świadczy o efektywnym przenoszeniu się większości miRNA z komórek rodzicielskich MSCs do ich pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Przeprowadzona analiza umożliwiła także wytypowanie miRNA, które występują wyłącznie w MSC-EVs (są poniżej progu detekcji w komórkach MSCs, co może świadczyć m.in. o tym, że komórki wykazują tendencję do usuwania tych miRNA poza komórkę), a także miRNA, które występowały wyłącznie w komórkach MSCs (Rycina 26B).

Do 10 cząsteczek miRNA unikatowych dla MSC-EVs należą następujące miRNA: **1952**, **376a-3p**, **182-5p**, **668-3p**, **1188-5p**, **409-5p**, **339-3p**, **325-3p**, **369-3p**, **466f-5p**, natomiast do 11 cząsteczek miRNA unikatowych dla komórek MSCs należą następujące miRNA: **369-5p**, **758-3p**, **92b-3p**, **671-3p**, **466k**, **293-3p**, **327**, **298-5p**, **1967**, **103-2-5p**, **125b-2-3p**. W Tabeli 27 przedstawiono listę miRNA, które zidentyfikowano w preparatach MSC-EVs, dla których różnica w ekspresji pomiędzy próbką MSC-EVs, a próbką komórek MSCs wynosiła powyżej 1 cyklu amplifikacji, co świadczy o ich różnym stężeniu w badanych komórkach oraz EVs.

Wśród miRNA wzbogaconych, selektywnie pakowanych do MSC-EVs należy m.in. **miRNA-182-5p**, którego wyciszenie powoduje aktywację proliferacji komórek raka nerkowokomórkowego (220), jak również **miRNA-339-3p** pełniące rolę inhibitora inwazyjności komórek czerniaka (221), natomiast **miRNA-1188** promuje różnicowanie neuronalne komórek MSCs oraz aktywację białka STAT1 (222). Co więcej, zaobserwowano nieznaczne wzbogacenie pęcherzyków MSC-EVs w **miRNA-126-3p** (Tabela 27), które opisywane jest w literaturze jako miRNA o działaniu proangiogennym (223), co potwierdziły także badania przeprowadzone przez naszą grupę w ramach realizacji innego projektu badawczego. Do ważniejszych miRNA zidentyfikowanych w MSC-EVs należą także: **miRNA-132**, które hamuje apoptozę i stres oksydacyjny w komórkach miokardium w sytuacji niewydolności serca (224) oraz wzmacnia potencjał proangiogeny komórek śródbłonna (195), a także **miRNA-382**, którego nadekspresja znacząco zwiększa proliferację komórek śródbłonna, ich migrację oraz tworzenie kapilar (225).

Baza miRDB (<http://mirdb.org>) dostarcza informacji na temat docelowych mRNA dla miRNA. Ze względu na mnogość docelowych mRNA dla wymienionych miRNA, funkcje tych cząstek mogą być inne niż wymienione na podstawie doniesień literaturowych, a także mogą zależeć od działania innych miRNA, które są obecne i aktywne w danym momencie w komórce, co stanowi wyzwanie dla dalszych analiz wyników uzyskanych w niniejszej pracy.



Rycina 26. Analiza składu miRNA w komórkach MSCs oraz MSC-EVs. **A.** Wykres rozproszenia (tzw. *scatter plot*) porównujący ekspresję wszystkich miRNA zidentyfikowanych w komórkach MSCs i MSC-EVs. Punkty wykresu odpowiadają poszczególnym miRNA. Ct- numer cyklu, w którym dany produkt ulega amplifikacji. **B.** Liczba miRNA zidentyfikowanych w komórkach MSCs oraz MSC-EVs (miRNA wspólne), a także miRNA unikatowych zidentyfikowanych wyłącznie w jednej grupie.

Tabela 27. Lista miRNA zidentyfikowanych w preparatach MSC-EVs. Lista zawiera dane przedstawione na wykresie rozproszenia dla których różnica wartości Ct (świadczących pośrednio o koncentracji transkryptów) pomiędzy próbką MSC-EVs a próbką komórek MSCs wynosiła powyżej 1 cyklu amplifikacji ($< -1,00$). Bardziej ujemna wartość różnicy Ct koreluje z wyższą zawartością danych transkryptów miRNA w preparatach MSC-EVs w odniesieniu do komórek MSCs. Zielonym kolorem zaznaczono miRNA szczególnie istotne z punktu widzenia badań objętych niniejszą pracą doktorską.

miRNA	Cykl amplifikacji (Ct)		Różnica Ct (Y-X)
	Ct MSCs (X)	Ct MSC-EVs (Y)	
miRNA-1952	40,00	32,11	-7,89
miRNA-376a-3p	40,00	32,31	-7,69
miRNA-182-5p	40,00	32,40	-7,60
miRNA-668-3p	40,00	33,00	-7,00

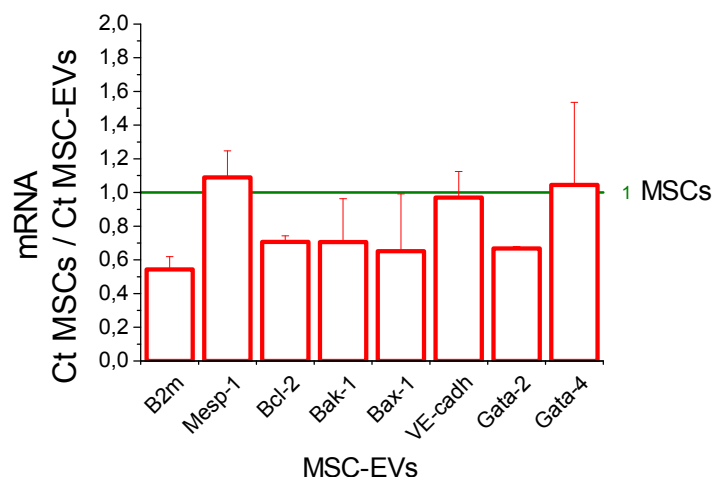
miRNA-1188-5p	40,00	35,33	-4,67
miRNA-409-5p	40,00	35,72	-4,28
miRNA-339-3p	40,00	36,14	-3,86
miRNA-325-3p	40,00	36,27	-3,73
miRNA-369-3p	40,00	36,39	-3,61
miRNA-382-5p	30,69	27,11	-3,58
miRNA-148b-5p	38,47	35,17	-3,30
miRNA-187-3p	35,82	32,95	-2,87
miRNA-542-5p	35,89	33,09	-2,80
miRNA-344d-3p	36,67	34,03	-2,64
miRNA-344b-3p	36,77	34,30	-2,48
miRNA-409-3p	33,15	30,75	-2,41
miRNA-466f-5p	40,00	37,67	-2,33
miRNA-466f	36,34	34,07	-2,27
miRNA-541-5p	31,17	29,00	-2,18
miRNA-202-3p	37,01	34,87	-2,13
miRNA-761	36,49	34,44	-2,05
miRNA-337-5p	34,31	32,34	-1,97
miRNA-346-5p	38,52	36,56	-1,96
miRNA-433-3p	35,12	33,16	-1,96
miRNA-379-5p	30,19	28,24	-1,95
miRNA-678	38,87	37,00	-1,87
miRNA-543-3p	34,18	32,32	-1,86
miRNA-214-3p	27,90	26,12	-1,78
miRNA-337-3p	34,92	33,18	-1,74
miRNA-669i	36,13	34,41	-1,72
miRNA-2137	29,90	28,23	-1,68
miRNA-411-5p	31,75	30,08	-1,67
miRNA-34c-3p	35,01	33,41	-1,60
miRNA-409a-3p	35,50	33,92	-1,58
miRNA-1951	33,92	32,37	-1,55
miRNA-434-5p	31,35	29,81	-1,54
miRNA-196a-5p	28,10	26,63	-1,47
miRNA-883a-5p	38,93	37,50	-1,43
miRNA-132-3p	30,79	29,36	-1,43
miRNA-106b-3p	34,10	32,70	-1,40
miRNA-127-3p	29,15	27,76	-1,39
miRNA-434-3p	30,89	29,51	-1,38
miRNA-196c-5p	33,30	31,97	-1,33
miRNA-676-3p	32,81	31,49	-1,33
miRNA-126-3p	33,24	31,94	-1,30
miRNA-34b-3p	30,82	29,52	-1,30
miRNA-99b-3p	32,38	31,09	-1,29
miRNA-214-3p	23,28	22,02	-1,26
miRNA-1199-5p	33,82	32,58	-1,25
miRNA-212-3p	32,48	31,24	-1,23
miRNA-871-5p	36,98	35,75	-1,23

miRNA-496a-3p	36,03	34,81	-1,23
miRNA-322-3p	32,75	31,54	-1,21
miRNA-1198-5p	33,60	32,40	-1,20
miRNA-30e-3p	33,75	32,55	-1,20
miRNA-28-3p	32,51	31,33	-1,18
miRNA-10b-5p	35,27	34,11	-1,17
miRNA-574-3p	29,46	28,30	-1,16
miRNA-744-3p	35,02	33,93	-1,09
miRNA-421-3p	33,45	32,38	-1,07
miRNA-134-5p	34,11	33,05	-1,06
miRNA-10b-5p	32,11	31,06	-1,06
let-7b-5p	23,01	21,95	-1,05
miRNA-382-3p	34,20	33,15	-1,04
miRNA-206-3p	31,52	30,50	-1,03
miRNA-30a-3p	33,73	32,72	-1,01

Podsumowując, analiza zawartości miRNA w komórkach rodzicielskich oraz MSC-EVs wykazała przenoszenie cząsteczek miRNA z komórek rodzicielskich do uwalnianych przez nie MSC-EVs. Co więcej, w preparatach MSC-EVs występowały 162 cząsteczki miRNA wspólne dla obu analizowanych grup, jak również miRNA unikatowe dla MSC-EVs, co świadczy o ich szczególnym wzbogaceniu w pęcherzykach. Wśród zidentyfikowanych miRNA znajdowały się cząsteczki potencjalnie istotne z punktu widzenia regulacji procesów towarzyszących regeneracji tkanek uszkodzonych w wyniku niedotlenienia.

W kolejnym etapie pracy zbadano amplifikację wybranych transkryptów mRNA obecnych w badanych komórkach MSCs oraz MSC-EVs (Rycina 27). Wykonana analiza wykazała przenoszenie badanych cząsteczek mRNA - zaangażowanych w apoptozę (Bcl-2, Bax-1, Bak-1), angiogenezę (VE-kadheryna, Gata-2) oraz kardiomiogenezę (Gata-4), a także markera komórek MSCs - Mesp-1 - z komórek MSCs do MSC-EVs (Rycina 27). W przypadku genów dla Mesp-1, VE-kadheryny oraz Gata-4, poziom transkryptów w MSC-EVs był porównywalny do poziomu tych transkryptów w komórkach rodzicielskich. W przypadku pozostałych genów transkrypty były obserwowane w niższym stężeniu w pęcherzykach niż w komórkach MSCs, ale wciąż na poziomie wystarczającym do ich detekcji.

Podsumowując, przeprowadzona analiza obecności cząsteczek miRNA oraz wybranych transkryptów mRNA wykazała, że MSC-EVs uwalniane przez komórki MSCs mogą zawierać większość tych cząsteczek charakterystycznych dla komórek rodzicielskich, co pozwala przypuszczać, że mogą one także potencjalnie przenosić je do innych komórek docelowych.



Rycina 27. Analiza obecności wybranych mRNA w MSC-EVs. Na wykresie przedstawiono stosunek wartości Ct badanych transkryptów w komórkach MSCs do wartości Ct dla transkryptów w MSC-EVs. Przyjęto, że poziom mRNA dla badanych genów w komórkach MSCs jest równy 1,0. Wartości przedstawiają: Średnia $\pm$ SD, N=3.

W związku z powyższym, ze względu na istotne znaczenie biologiczne miRNA oraz innych cząsteczek zidentyfikowanych wewnątrz MSC-EVs, w kolejnym etapie pracy badano wpływ MSC-EVs (przenoszących opisaną bioaktywną zawartość) na komórki docelowe w układzie *in vitro*.

4.6. Oddziaływanie MSC-EVs z komórkami śródbłónka naczyń serca i ich wpływ na wybrane funkcje komórek *in vitro*

W opisaney powyżej części prac badawczych poświęconej szczegółowej charakterystyce składu molekularnego MSC-EVs, wykazano, że populacja wyizolowanych pęcherzyków z komórek MSCs zawiera zarówno frakcję ektosomów przenoszących antygeny powierzchniowe charakterystyczne dla komórek rodzicielskich, jak również wykazuje wzbogacenie we frakcję egzosomów. Co ważniejsze, MSC-EVs mogą przenosić szereg białek, miRNA i mRNA pochodzących z rodzicielskich komórek MSCs, które to mogą być potencjalnie zaangażowane m.in. w procesy związane z regeneracją uszkodzonych tkanek. Co więcej, analiza bioinformatyczna danych proteomicznych wykazała, że MSC-EVs zawierają 106 białek, które mogą być zaangażowane w adhezję do komórek (lista tych białek została przedstawiona w Załączniku, p. 8.1. Tabele, Tabela I). Obserwacje te pozwalają przypuszczać, że MSC-EVs mogą oddziaływać z komórkami docelowymi i przenosić swoją bioaktywną zawartość modulując ich funkcje, co postanowiono zbadać w dalszej części pracy.

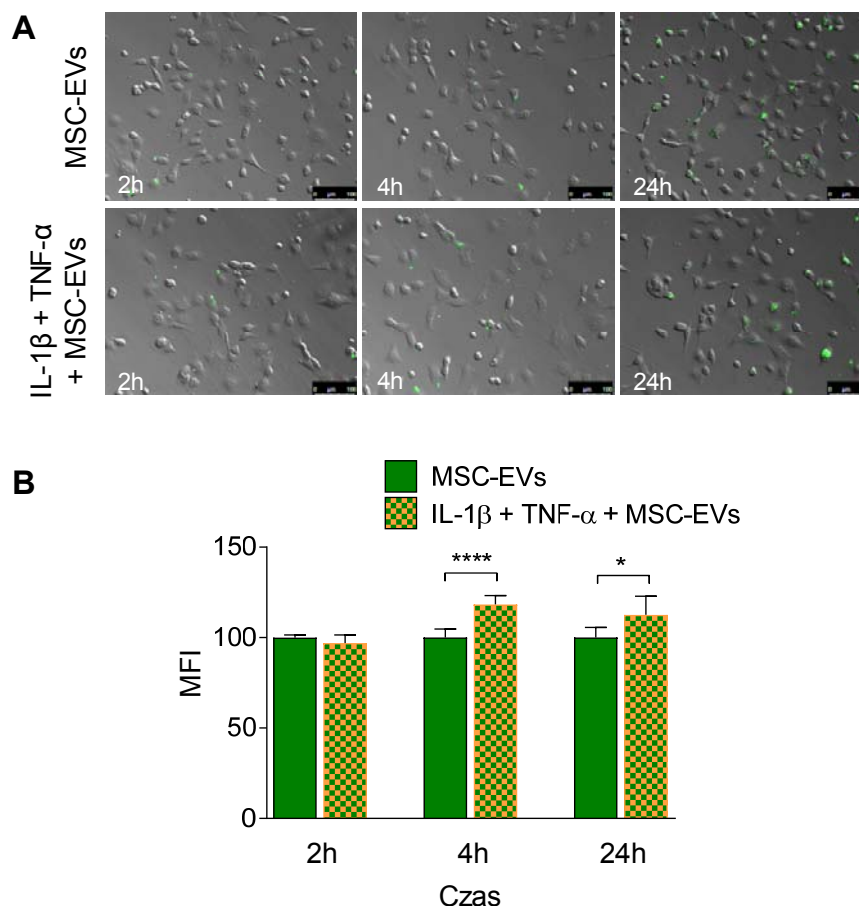
W związku z powyższym, w kolejnym etapie prac, zbadano internalizację wybarwionych fluorescencyjnie MSC-EVs przez mysie komórki śródbłónka naczyń serca (ang. *mouse cardiac endothelial cells*, MCEC). Poziom internalizacji zbadano zarówno w warunkach kontrolnych, jak również w warunkach imitujących mikrośrodowisko uszkodzonego mięśnia sercowego, tj. w hipoksji oraz w obecności cytokin prozapalnych -

IL-1 β oraz TNF- α . W tym celu, 24h przed dodaniem MSC-EVs do komórek MCEC, komórki te traktowano w/w cytokinami prozapalnymi w warunkach hipoksji, w pożywce z obniżoną zawartością surowicy.

Stan zapalny – towarzyszący również niedokrwienemu uszkodzeniu tkanek - jest procesem, podczas którego następuje aktywacja śródbłónka naczyniowego, wskutek czego wzrasta gęstość określonych antygenów powierzchniowych związanych m.in. z adhezją komórkową (226), co potencjalnie może przyczynić się do zwiększonej internalizacji MSC-EVs przez komórki akceptorowe.

W niniejszej pracy, po 2h od dodania wybarwionych fluorescencyjnie MSC-EVs nie obserwowano wzrostu średniej intensywności fluorescencji (ang. *mean fluorescence intensity*, MFI) komórek MCEC hodowanych w warunkach imitujących mikrośrodowisko stanu zapalnego w porównaniu do komórek kontrolnych (hodowanych w standardowych warunkach), do których również dodawano MSC-EVs (Rycina 28). Jednakże po 4h od momentu dodania MSC-EVs zaobserwowano istotny wzrost MFI komórek MCEC stymulowanych wcześniej cytokinami prozapalnymi w odniesieniu do komórek kontrolnych, co świadczy o zwiększonej internalizacji MSC-EVs przez aktywowane komórki MCEC. Wzrost ten utrzymywał się do 24h od momentu dodania MSC-EVs, kiedy to zakończono eksperyment (Rycina 28A, B).

Uzyskane wyniki świadczą o tym, że komórki śródbłónka internalizują MSC-EVs zarówno w warunkach natywnych, jak również po ich aktywacji. Jednakże komórki aktywowane czynnikami prozapalnymi wykazują zwiększoną internalizację MSC-EVs, co może mieć istotne znaczenie dla ich aktywności biologicznej w komórkach docelowych - w warunkach stanu zapalnego. Obserwacje te miały istotne znaczenie dla interpretacji dalszych wyników uzyskanych w pracy.

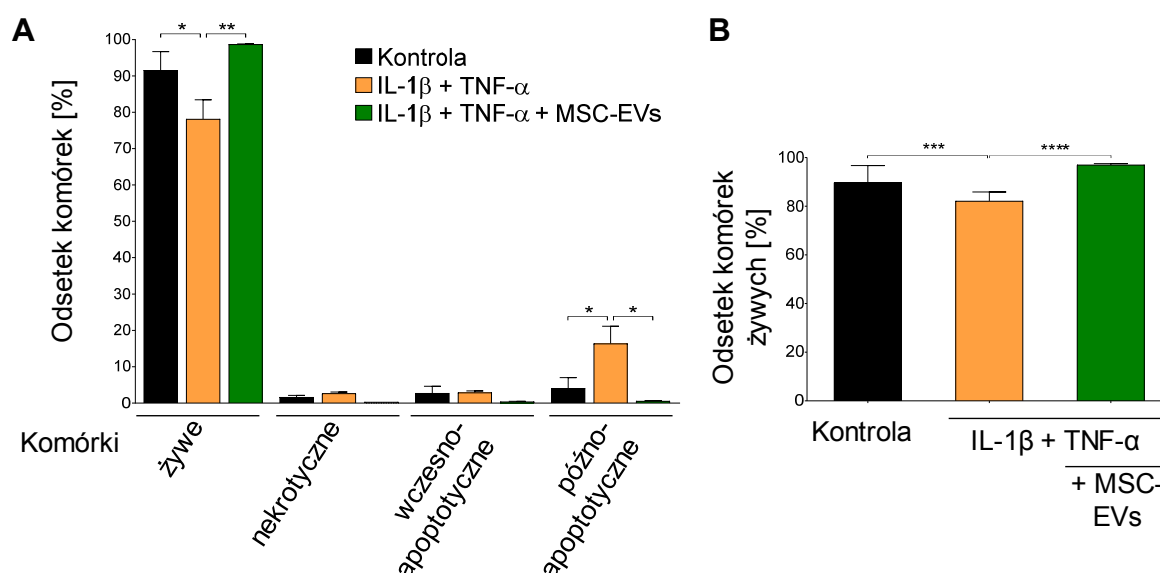


Rycina 28. Ocena internalizacji MSC-EVs przez komórki MCEC w warunkach kontrolnych oraz w warunkach imitujących mikrośrodowisko uszkodzonego mięśnia sercowego (hipoksja oraz obecność cytokin prozapalnych) *in vitro*. **A.** Górny panel - Reprezentatywne zdjęcia komórek MCEC w standardowych warunkach hodowlanych (kontrola) inkubowanych z MSC-EVs wybarwionymi barwnikiem DiO (zielony) oraz CYTO RNA Select (zielony). Dolny panel - Reprezentatywne zdjęcia komórek MCEC w obecności cytokin prozapalnych IL-1 β , TNF- α (każda 10 ng/ml) w warunkach hipoksji (1% O₂) w pożywce z 1% FBS oraz inkubowanymi z MSC-EVs wybarwionymi DiO (zielony) oraz CYTO RNA Select (zielony) po 2, 4 oraz 24h od momentu dodania MSC-EVs. Skala: 100 μ m. **B.** Analiza półilościowa internalizacji MSC-EVs przez komórki MCEC po 2, 4 oraz 24h od momentu dodania MSC-EVs. Na osi Y przedstawiono średnią intensywność fluorescencji (ang. *mean fluorescence intensity*, MFI) komórek zmierzoną przy użyciu aplikacji ImageJ. Wartości przedstawiają: Średnia $\pm$ SD, *P<0,05; ****P<0,0001 (test t-studenta), N=3.

W związku z tym, że internalizacja MSC-EVs przez komórki MCEC w warunkach imitujących mikrośrodowisko stanu zapalnego jest wyższa niż w standardowych warunkach hodowlanych, w następnym etapie zbadano czy zwiększona internalizacja MSC-EVs w warunkach zapalenia *in vitro*, może wpływać na właściwości biologiczne komórek akceptorowych.

W pierwszej kolejności zbadano wpływ MSC-EVs na żywotność komórek MCEC w warunkach imitujących stan zapalny (w obecności IL-1 β i TNF- α), hodowanych w hipoksji w pożywce z obniżoną zawartością surowicy oraz w warunkach kontrolnych.

Co istotne, uzyskane wyniki wykazały istotny statystycznie wzrost żywotności komórek inkubowanych w warunkach imitujących stan zapalny - po 4h od momentu dodania MSC-EVs, w porównaniu do komórek, którym nie podano MSC-EVs (odpowiednio $98,7 \pm 0,1\%$ vs. $78,2 \pm 5,3\%$ komórek żywych, Rycina 29A). Co więcej, żywotność komórek po inkubacji z MSC-EVs była wyższa niż żywotność komórek kontrolnych ($98,7 \pm 0,1\%$ vs. $91,5 \pm 5,1\%$, Rycina 29A), nawet jeśli komórki śródbłonna nie były ekspozowane na działanie cytokin zapalnych. Uzyskane wyniki wskazały na istotny statystycznie spadek odsetka komórek późno-apoptotycznych w populacji aktywowanych komórek śródbłonna, które były następnie inkubowane z MSC-EVs, w porównaniu z komórkami aktywowanymi, ale do których nie dodawano MSC-EVs (Rycina 29A). Analiza żywotności komórek w warunkach kontrolnych, imitujących mikrośrodowisko stanu zapalnego oraz w warunkach mikrośrodowiska stanu zapalnego i obecności MSC-EVs została także niezależnie przeprowadzona przy użyciu barwnika DAPI. Otrzymane wyniki potwierdziły korzystny wpływ MSC-EVs na żywotność komórek docelowych, w warunkach imitujących mikrośrodowisko stanu zapalnego (Rycina 29B).



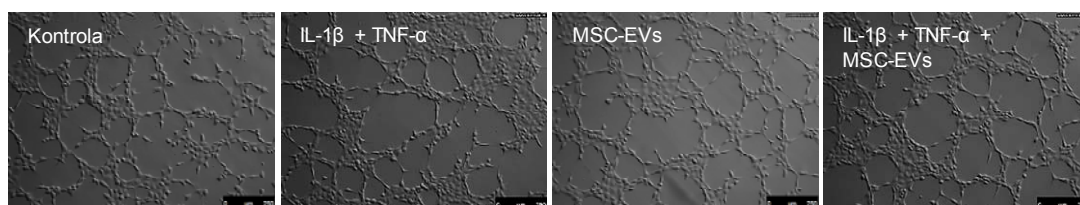
Rycina 29. Ocena wpływu MSC-EVs na żywotność komórek MCEC *in vitro*. Analiza żywotności komórek MCEC w warunkach kontrolnych (Kontrola) oraz po aktywacji komórek MCEC (za pomocą IL-1 β oraz TNF- α), którym następnie niepodawano lub podawano preparaty MSC-EVs. Inkubację z MSC-EVs prowadzono przez 4h, a następnie analizę wykonano przy użyciu cytometrii przepływowej. **A.** Żywotność komórek oraz poziom komórek apoptotycznych i nekrotycznych w populacji - analizowane przy użyciu zestawu zawierającego aneksynę V oraz jodek propidyny (PI). **B.** Żywotność komórek MCEC oznaczona z zastosowaniem barwnika DAPI. Wartości przedstawiają: Średnia $\pm$ SD, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ (test t-studenta), $N=3$.

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały, że MSC-EVs wywierają efekt cytoprotekcyjny i antyapoptotyczny na komórki śródbłonna serca – stanowiące model komórek docelowych *in vitro*, i efekt ten jest widoczny już krótko po dodaniu MSC-EVs do tych komórek.

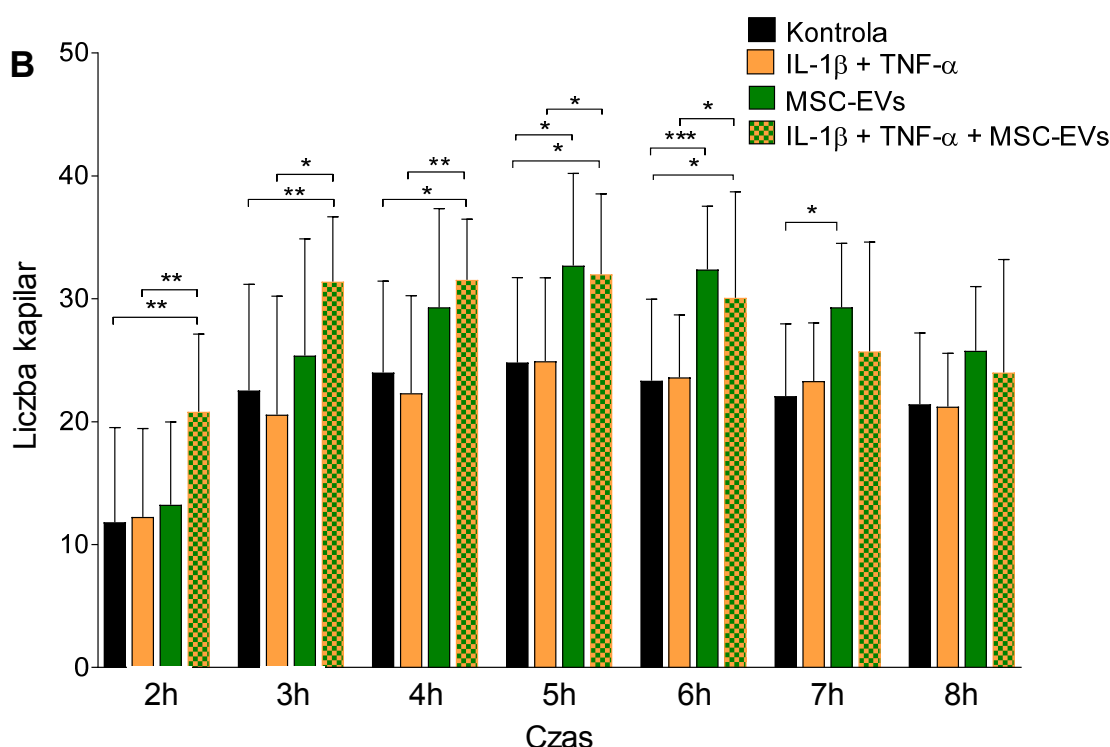
W następnym etapie, zbadano potencjał angiogeny komórek MCEC w warunkach kontrolnych oraz w warunkach obecności mediatorów stanu zapalnego, które były poddawane działaniu MSC-EVs, z zastosowaniem testu formowania kapilar na podłożu matryzelowym *in vitro* (208) (Rycina 30).

W wyniku przeprowadzonego badania zaobserwowano istotny statystycznie wzrost aktywności angiogennej niestymulowanych cytokinami prozapalnymi komórek MCEC po 5, 6 i 7h po dodaniu MSC-EVs, w porównaniu z komórkami kontrolnymi, które nie były inkubowane z MSC-EVs (Rycina 30). W przypadku komórek inkubowanych wyłącznie z mediatorami stanu zapalnego nie obserwowano wpływu tych mediatorów na potencjał angiogeny komórek MCEC w porównaniu do komórek kontrolnych. Natomiast istotny wzrost aktywności angiogennej komórek MCEC obserwowano także w warunkach imitujących stan zapalny, ale po dodaniu MSC-EVs - w każdym punkcie eksperymentalnym od 2 do 6h trwania eksperymentu (Rycina 30B).

A



B



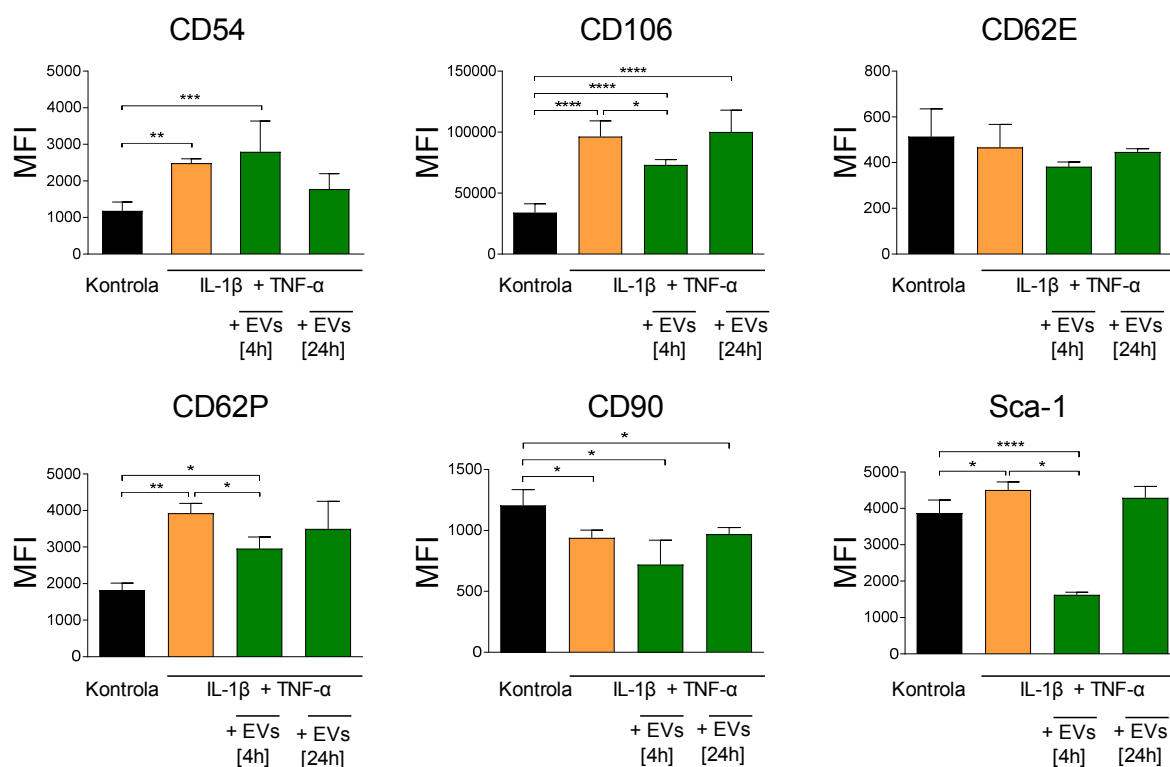
Rycina 30. Ocena wpływu MSC-EVs na potencjał angiogeny komórek MCEC *in vitro*.
A. Reprezentatywne zdjęcia struktur kapilaropodobnych utworzonych przez komórki MCEC w warunkach kontrolnych (kontrola), po stymulacji cytokinami prozapalnymi (IL-1 β , TNF- α) oraz w/bez obecności MSC-EVs. Skala: 250 μ m. **B.** Analiza półilościowa liczby struktur kapilaropodobnych w przeliczeniu na pole mikroskopowe dla kontrolnych komórek MCEC oraz komórek MCEC stymulowanych mediatorami stanu zapalnego (IL-1 β , TNF- α) oraz w/bez obecności MSC-EVs. Wartości przedstawiają: Średnie $\pm$ SD, *P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001 (test t-studenta), N=3.

W celu wyjaśnienia zaobserwowanej zwiększonej internalizacji MSC-EVs do komórek docelowych, jak również ich wpływu na potencjał angiogeny komórek w mikrośrodowisku zapalnym, w kolejnym etapie zbadano ekspresję wybranych receptorów charakterystycznych dla aktywowanego śródbłónka naczyniowego, takich jak CD54, CD106, CD62E, CD62P oraz dodatkowo dwóch wybranych antygenów kontrolnych (CD90, Sca-1) – na powierzchni aktywowanych oraz kontrolnych komórek MCEC po oraz bez inkubacji z MSC-EVs.

Wykazano, że stymulacja komórek MCEC cytokinami prozapalnymi w warunkach hipoksji i ograniczonego stężenia substancji odżywczych spowodowała wzrost gęstości następujących antygenów: CD54, CD106, CD62P oraz antygenu kontrolnego Sca-1 na ich powierzchni - w odniesieniu do komórek kontrolnych (Rycina 31). W przypadku drugiego antygenu kontrolnego, tj. CD90, nie obserwowano istotnego wzrostu gęstości tego antygeny na powierzchni komórek aktywowanych cytokinami prozapalnymi.

Ekspresja antygeny CD54, czyli cząsteczki ICAM-1, której ligandem jest integryna LFA-1, ulegała nieznacznemu zwiększeniu w aktywowanych komórkach MCEC po 4h inkubacji z MSC-EVs w odniesieniu do aktywowanych komórek MCEC, ale bez dodatku MSC-EVs (Rycina 31). Co ciekawe, ekspresja antygeny CD106, czyli cząsteczki VCAM-1 oddziałującej z integryną VLA-4, zmalała w komórkach aktywowanych po inkubacji z MSC-EVs, w porównaniu do komórek MCEC stymulowanych cytokinami prozapalnymi, ale nieinkubowanymi z MSC-EVs. Może to sugerować obecność na powierzchni MSC-EVs ligandów wiążących antygen CD106, wskutek czego dochodzi do wiązania się MSC-EVs do powierzchni tych komórek i blokowania miejsc wiązania przeciwciał skierowanych przeciwko cząsteczkom CD106. Ekspresja antygeny CD106 w komórkach aktywowanych po 24h inkubacji z MSC-EVs była zbliżona do poziomu obserwowanego w tych samych komórkach, ale nieinkubowanych z MSC-EVs. Może to potwierdzać wcześniejsze obserwacje, że spadek CD106 obserwowany po 4h inkubacji z MSC-EVs mógł być spowodowany oddziaływaniem ligandów obecnych na MSC-EVs z cząsteczkami CD106 na powierzchni komórek akceptorowych.

Podobne zjawisko obserwowano w przypadku antygeny CD62P, natomiast w przypadku cząsteczki CD62E wartości MFI dla warunków badanych nie wykazały istotnych statystycznie zmian (Rycina 31). Co ciekawe, po 4h inkubacji aktywowanych komórek MCEC z MSC-EVs obserwowano spadek gęstości antygeny Sca-1 na powierzchni badanych komórek. Wyniki badań światowych wskazują, że antygen Sca-1 może wiązać się z kompleksem integryn $\alpha V\beta 3$ i stymulować m.in. adhezję komórek satelitarnych mięśni (227). Ponieważ na powierzchni MSC-EVs występują integryny αV oraz $\beta 3$, takie oddziaływania mogą zatem zachodzić między komórkami MCEC, a MSC-EVs, co tłumaczy obserwowany spadek dostępności antygeny Sca-1 dla przeciwciała skierowanego przeciwko temu antygenowi obserwowany po dodaniu pęcherzyków. Z przeprowadzonej analizy wynika, że w obecności mediatorów stanów zapalnego zwiększonej ekspresji ulegają te cząsteczki, które są zaangażowane w oddziaływanie śródbłónka naczyniowego z ich swoistymi ligandami w sytuacji toczącego się stanu zapalnego.



Rycina 31. Ekspresja wybranych antygenów charakterystycznych dla aktywowanego śródbłonna naczyniowego oraz antygenów kontrolnych na powierzchni komórek MCEC. Komórki MCEC stymulowano IL-1 β , TNF- α oraz inkubowano z MSC-EVs (EVs), a następnie po 4 i 24h barwiono przeciwciałami skierowanymi przeciwko badanym antygenom. Bezpośrednio przed analizą, do każdej próbki dodawano DAPI w celu odróżnienia komórek żywych od martwych. Analizę cytometryczną przeprowadzono na żywych komórkach (DAPI). Wartości przedstawiają: Średnia $\pm$ SD, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ (test t-studenta), $N = 3$.

Podsumowując, przeprowadzone w tej części badania wykazały zwiększoną internalizację MSC-EVs do komórek akceptorowych w warunkach imitujących mikrośrodowisko stanu zapalnego (obecność cytokin prozapalnych - IL-1 β i TNF- α , warunki hipoksji, obniżona zawartość surowicy). MSC-EVs wykazują działanie cytoprotekcyjne na komórki MCEC, a także zwiększają ich potencjał proangiogeny. Co więcej, wykazano, że ekspozycja komórek śródbłonna na działanie mediatorów stanu zapalnego powoduje wzrost gęstości markerów charakterystycznych dla aktywowanego śródbłonna naczyniowego, co częściowo może tłumaczyć zwiększoną internalizację MSC-EVs do komórek docelowych.

4.7. Badanie retencji MSC-EVs podanych dożylnie w mysim modelu zawału mięśnia sercowego *in vivo*

W związku z uzyskanymi wynikami badań *in vitro*, wskazującymi m.in. na możliwe oddziaływania MSC-EVs z komórkami śródbłonna naczyń serca, a w szczególności w warunkach zapalnych imitujących mikrośrodowisko uszkodzonego w

wyniku niedotlenienia mięśnia sercowego (tj. obecność mediatorów stanu zapalnego, hipoksja), w kolejnym etapie badań objętych niniejszą pracą, zbadano retencję wybarwionych fluorescencyjnie nanocząsteczek MSC-EVs podanych dożylnie w mysim modelu ostrego niedotlenienia mięśnia sercowego (ang. *acute myocardial infarction*, AMI) w różnych narządach, ze szczególnym uwzględnieniem mięśnia sercowego.

Badania te zostały wykonane w czasie mojego pobytu w Cardiovascular Research Institute, Division of Cardiovascular Diseases, University of Kansas Medical Center, Kansas City w USA, finansowanego w ramach projektu ETIUDA pt. „*Ocena potencjału biologicznego mikropęcherzyków z hodowli antygenowo zdefiniowanych komórek macierzystych szpiku kostnego dla celów regeneracji tkanek*”.

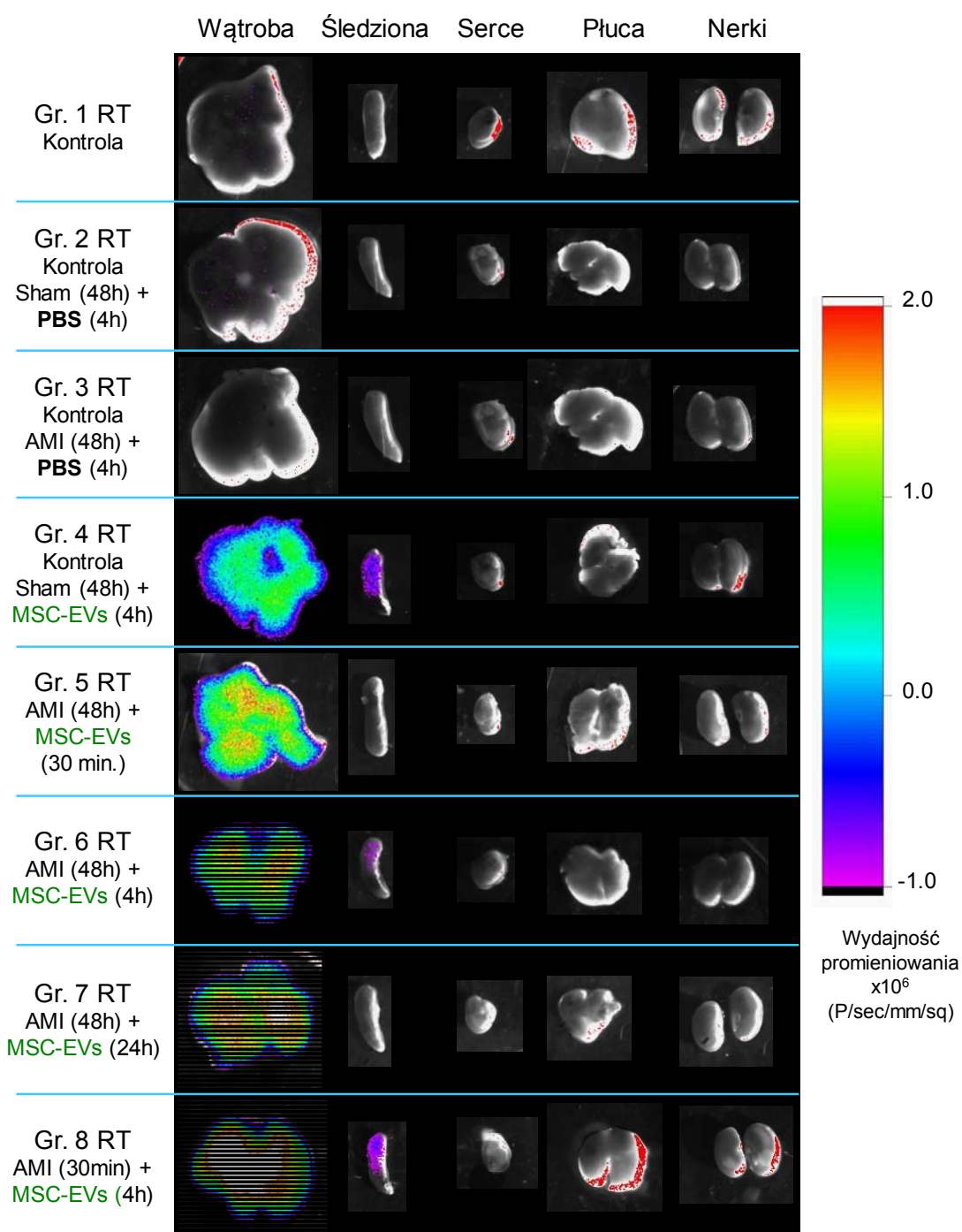
W celu przeprowadzenia tych badań, MSC-EVs zostały wybarwione fluorescencyjnie za pomocą lipofilnego barwnika DiR, którego widmo emisja przypada w dalekiej czerwieni (E_x/E_m 750/780 nm). Następnie tak wybarwione MSC-EVs podawano do żyły szyjnej zwierząt poddanych zabiegowi AMI w dwóch punktach czasowych: po 48h lub po 30 min. od reperfuzji. W wybranych punktach czasowych, od zwierząt kontrolnych oraz po zabiegu AMI, izolowano narządy w celu detekcji emitowanego sygnału fluorescencji świadczącej o obecności MSC-EVs w tych tkankach.

Uzyskane wyniki badań wykazały akumulację MSC-EVs głównie w wątrobie (we wszystkich grupach zwierząt, którym podano wybarwione fluorescencyjnie MSC-EVs), a także w śledzionie (wyłącznie u zwierząt, od których pobrano narządy po 4h od podania MSC-EVs). Co istotne, nie obserwowano natomiast obecności MSC-EVs w sercu, płucach oraz nerkach (Rycina 32). We krwi zwierząt pobranej z lewej komory (LK) serca także nie obserwowano sygnału fluorescencji (Tabela 28), co może świadczyć o tym, że MSC-EVs są bardzo szybko usuwane z krążenia. W Tabeli 28 przedstawiono podsumowanie obrazowania wybranych tkanek i narządów dla badanych grup zwierząt.

W kolejnym etapie przygotowano skrawki mrożeniowe wątroby, śledziony oraz serca pobrane od zwierząt po 4h od momentu podania MSC-EVs lub PBS (odpowiednio Gr. 6 RT i Gr. 3 RT), które analizowano techniką mikroskopii konfokalnej w celu weryfikacji wyników uzyskanych za pomocą In Vivo Optical Imaging System. Przeprowadzone badania potwierdziły retencję MSC-EVs w wątrobie oraz śledzionie (Rycina 33 i 34). Nieznaczny wzrost średniej wartości sygnału obserwowano także w mięśniu sercowym (Rycina 34). Co ważniejsze, można było zaobserwować pojedyncze skupisko czerwonych obiektów w tkankach mięśnia sercowego (Rycina 33), co może świadczyć o niewielkiej, ale jednak zachodzącej akumulacji MSC-EVs w tym organie (będącej poniżej progu detekcji wykorzystanej aparatury do obrazowania sygnału fluorescencji całych organów).

Pomimo tego, że nie obserwowano znacznej retencji MSC-EVs w mięśniu sercowym, co może być spowodowane m.in. szybką hemodynamiką tego narządu, doniesienia literaturowe wskazują, że EVs uzyskane z hodowli komórek progenitorowych serca podane dożylnie, mogą redukować obszar uszkodzenia pozawałowego mięśnia sercowego (195), a zatem muszą oddziaływać na uszkodzone tkanki w sercu. Wydaje się zatem prawdopodobne, że niewielka ilość MSC-EVs ulega retencji w miejscu uszkodzenia

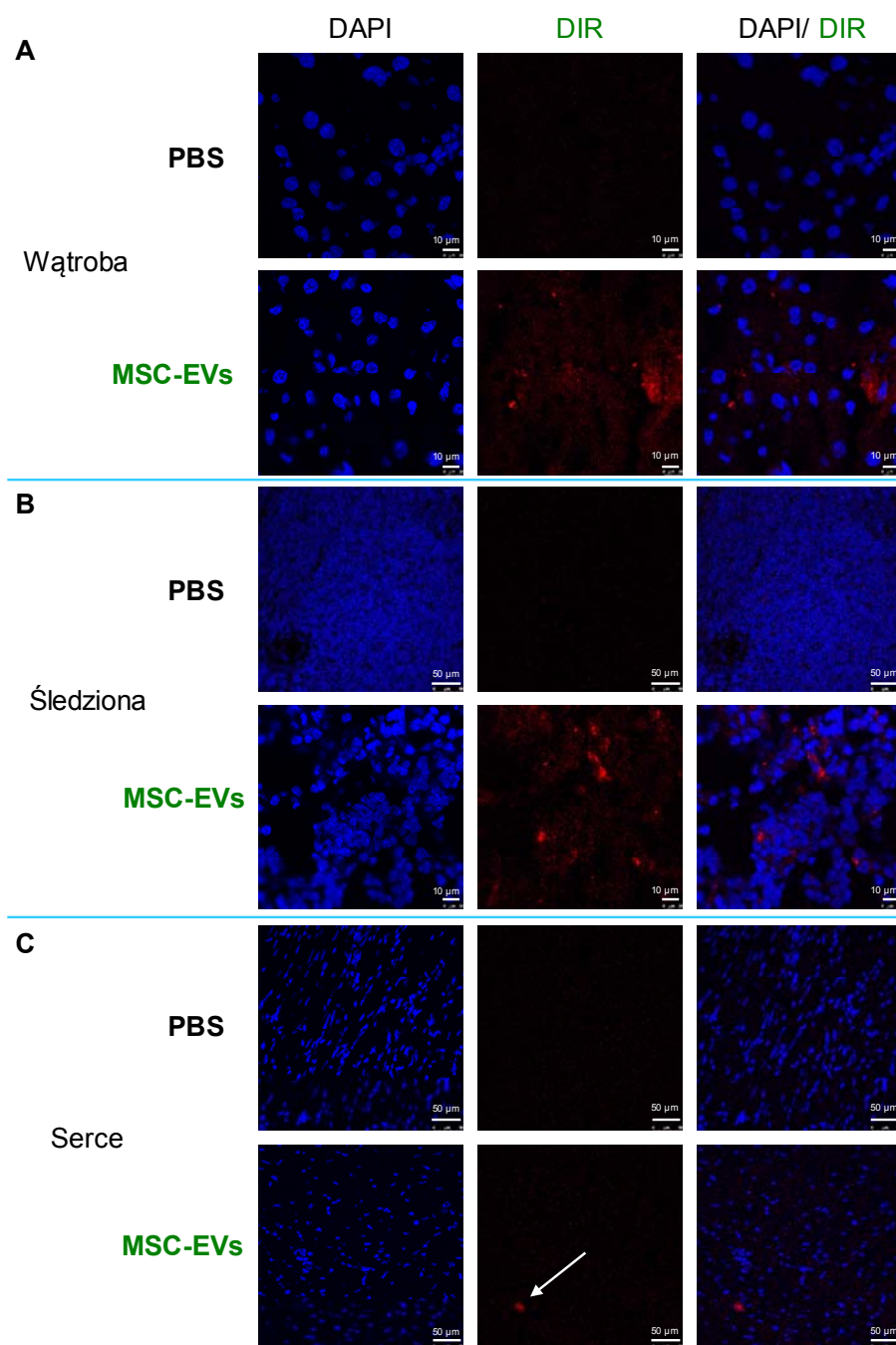
w mięśniu sercowym, jednak sygnał fluorescencji emitowanej po internalizacji MSC-EVs może być poniżej progu detekcji większości dostępnej infrastruktury badawczej.



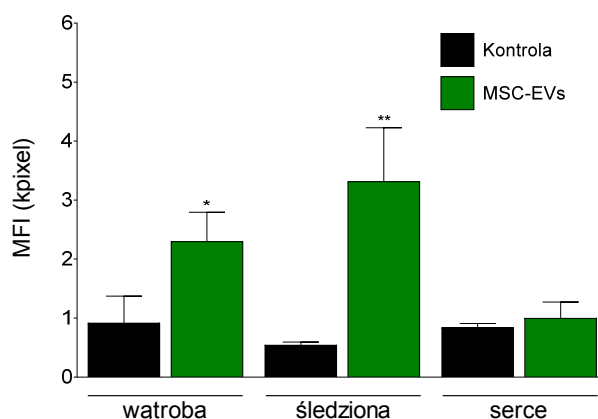
Rycina 32. Badanie retencji MSC-EVs w wybranych narządach u myszy poddanych zabiegowi AMI. MSC-EVs wybarwiono fluorescencyjnie DiR, a następnie podawano do żyły szyjnej myszy (100 μ g w objętości 50 μ l). W określonych punktach czasowych, od myszy pobierano narządy w celu ich zobrazowania przy użyciu systemu In Vivo Optical Imaging System. Pod nazwą każdej grupy wpisano skrótowy opis grupy uporządkowany w następującej kolejności: rodzaj zabiegu (czas od reperfuzji po którym podawano MSC-EVs lub PBS) + rodzaj podawanego preparatu (czas od podania po którym zwierzęta poddawano eutanazji w celu pobrania tkanek i narządów). Szczegółowy opis grup zwierząt zamieszczono w rozdziale *Materiały i Metody* w Tabeli 18.

Tabela 28. Podsumowanie wyników badania retencji wybarwionych fluorescencyjnie MSC-EVs w wybranych narządach i tkankach w mysim modeli AMI.
Oznaczenia: (-) - brak sygnału fluorescencji; (+) - występowanie sygnału fluorescencji, (*) - autofluorescencja.

Grupa zwierząt	Detekcja w organach i tkankach								
	wątroba	śledziona	serce	płuca	nerki	przewód pokarmowy	krew z LK	kości	mięśnie kończyn dolnych
1 RT (Kontrola)	-	-	-	-	-	*	-	-	-
2 RT (Kontrola)	-	-	-	-	-	*	-	-	-
3 RT (Kontrola)	-	-	-	-	-	*	-	-	-
4 RT (Kontrola)	+	+	-	-	-	*	-	-	-
5 RT	+	-	-	-	-	*	-	-	-
6 RT	+	+	-	-	-	*	-	-	-
7 RT	+	-	-	-	-	*	-	-	-
8 RT	+	+	-	-	-	*	-	-	-



Rycina 33. Ocena mikroskopowa retencji MSC-EVs w wątrobie, śledzionie oraz sercu myszy poddanych zabiegowi AMI przy wykorzystaniu mikroskopii konfokalnej. Myszy poddano zabiegowi AMI. Po 48h po AMI, myszom podano roztwór soli PBS lub MSC-EVs. Narządy pobrano po 4h od momentu podania. Przedstawiono reprezentatywne zdjęcia skrawków preparatów mroźniowych organów pobranych od zwierząt, którym podawano roztwór soli PBS (górny panel) lub MSC-EVs (dolny panel). Zdjęcia wykonano w niebieskim kanale fluorescencji (DAPI) oraz kanale dla dalekiej czerwieni (DiR), jak również przedstawiono złożenie dwóch kanałów fluorescencji (DAPI/ DiR). **A.** Skrawki wątroby. **B.** Skrawki śledziony. **C.** Skrawki serca. Skala: 10 μm lub 50 μm.



Rycina 34. Analiza półilościowa retencji MSC-EVs w wątrobie, śledzionie oraz sercu myszy poddanych zabiegowi AMI. Myszy poddano zabiegowi AMI. Po 48h po AMI, myszom podano roztwór soli PBS lub MSCs-EVs. Narządy pobrano po 4h od momentu podania. Analiza wykonana przy użyciu oprogramowani Las X. Wartości przedstawiają: Średnia $\pm$ SD, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (test t-studenta). N = 3 (PBS), N = 6 (MSC-EVs).

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały, że MSC-EVs podane dożylnie u zwierząt poddanych zabiegowi AMI wykazują akumulację głównie w wątrobie oraz śledzionie, a jedynie w niewielkim stopniu są obecne w tkankach serca.

4.8. Badanie retencji MSC-EVs podanych dożylnie w mysim modelu niedokrwienego uszkodzenia kończyny *in vivo*

W następnym etapie realizacji badań w ramach niniejszej pracy doktorskiej zbadano retencję MSC-EVs (otrzymanych z hodowli komórek MSCs wykazujących ekspresję znacznika GFP) w mysim modelu niedokrwienego uszkodzenia kończyny (ang. *limb ischemia, LI*). Badania przeprowadziłam w czasie mojego stażu w INSERM U1063, Stress Oxydant et Pathologies Métaboliques, Institut de Biologie en Santé, Université d'Angers w Angers we Francji.

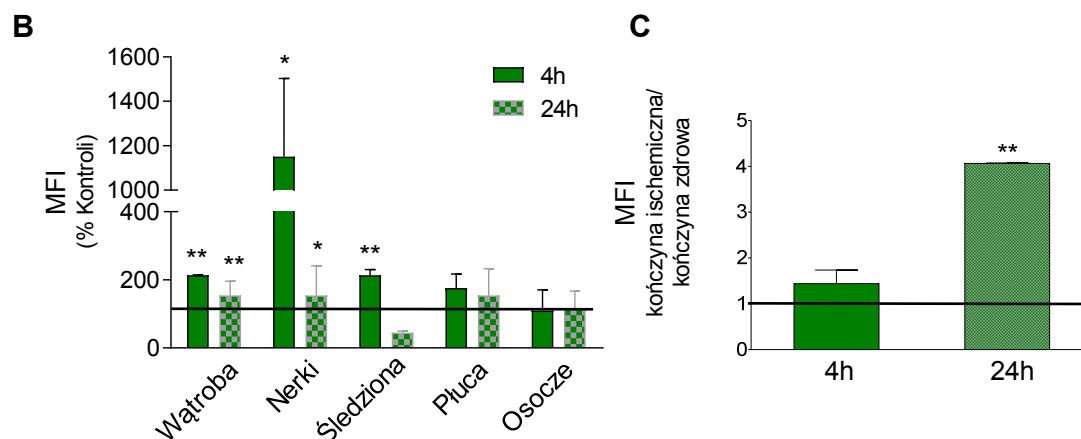
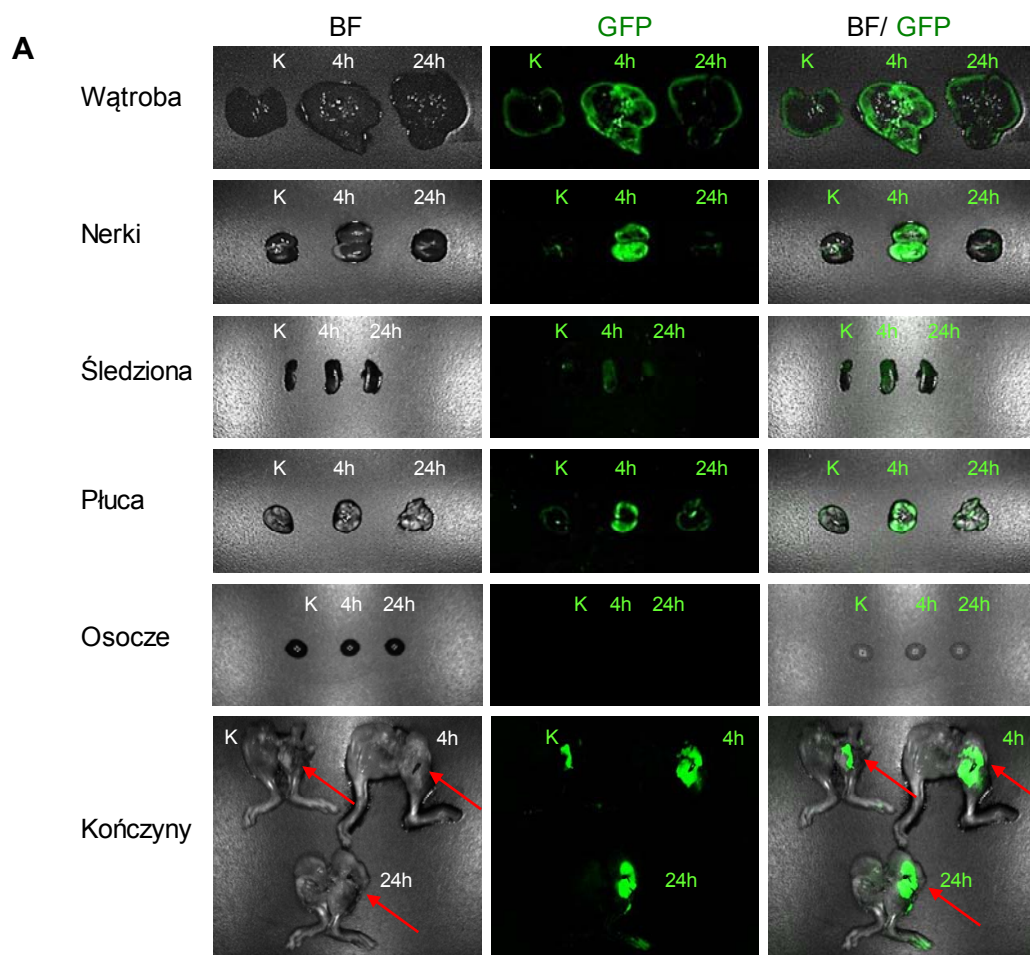
W tej części badań, po 24h od niedokrwienego uszkodzenia kończyny, zwierzętom podawano dożylnie (do żyły ogonowej) znakowane MSC-EVs lub sam nośnik - roztwór soli PBS. Po 4 lub 24h od podania, od myszy izolowano organy oraz pobierano krew z LK w celu detekcji sygnału fluorescencji pochodzącego z MSC-EVs. Organy analizowano przy użyciu systemu do obrazowania - Maestro In Vivo Imaging System.

Po 4h od dożylnego podania MSC-EVs, u myszy u których wcześniej wykonano zabieg uszkodzenia tkankowego, wykazano obecność pęcherzyków w następujących organach: wątrobie, nerkach, płucach oraz bardzo słaby sygnał w śledzionie. Po 24h od podania MSC-EVs, bardzo słaby sygnał fluorescencji utrzymywał się w wątrobie, nerkach oraz płucach (Rycina 35A, B). Nie obserwowano sygnału fluorescencji w osoczu krwi, co może świadczyć, że pęcherzyki są bardzo szybko usuwane z krążenia. Ze względu na to, że wykorzystany szczep myszy C57Bl/6J wykazuje autofluorescencję, wartości średniej

intensywności fluorescencji (MFI) dla poszczególnych organów przedstawiono w odniesieniu do wartości uzyskanych dla myszy grupy kontrolnej (której podano sól PBS), dla których przyjęto, że procent wartości MFI dla poszczególnych narządów wynosił 100%.

Analizie obecności MSC-EVs poddano także kończyny zdrowe oraz ischemiczne (niedotlenione) pobrane od myszy, którym podawano dożylnie MSC-EVs lub roztwór soli PBS. Co istotne, w niedokrwionych kończynach pobranych od zwierząt, którym podano MSC-EVs, zaobserwowano wyższy poziom fluorescencji po 4 oraz 24h od podania MSC-EVs – w porównaniu do kończyn ischemicznych myszy kontrolnych oraz kończyn zdrowych (Rycina 35A). W przypadku tej analizy, wyniki przedstawiono jako stosunek wartości MFI zmierzonej w kończynie niedotlenionej do wartości MFI uzyskanej dla kończyny zdrowej. Stosunek wartości MFI obserwowany u myszy, którym podawano MSC-EVs wynosił odpowiednio $1,44 \pm 0,29$ po 4h oraz $4,07 \pm 0,01$ po 24h, podczas gdy u myszy kontrolnych (którym podano sól PBS) był równy 1,0 (Rycina 35C). Świadczy to o akumulacji MSC-EVs w niedokrwionych tkankach kończyn.

Uzyskane wyniki wskazują na znacznie szerszą dystrybucję MSC-EVs w organach w uszkodzeniu ischemicznym kończyny LI niż obserwowano w modelu AMI. Może to być związane zarówno z różnym patofizjologicznym przebiegiem procesów towarzyszących uszkodzeniu w obu modelach, jak również z drogą podania – do żyły szyjnej w AMI oraz żyły ogonowej w LI. Warto wspomnieć, że podczas projektowania przyszłych potencjalnych leków biologicznych opartych o komórki macierzyste lub ich pochodne, efektywna droga podania tych preparatów jest jednym z ważniejszych aspektów badań przedklinicznych.



Rycina 35. Badanie retencji MSC-EVs w wybranych narządach oraz kończynach dolnych u myszy poddanych zabiegowi LI. MSC-EVs otrzymano z hodowli komórek MSCs z endogenną ekspresją znacznika GFP, a następnie po 24h od zabiegu LI podano myszom (po 100 μ g GFP⁺ MSC-EVs do żyły ogonowej w objętości nie większej niż 25 μ l). W określonych punktach czasowych od podania MSC-EVs (4 i 24h) od myszy pobierano wybrane narządy, krew oraz kończyny dolne w celu analizy średniego sygnału fluorescencji (MFI) w tych narządach oraz płynach ustrojowych. Badanie wykonano przy użyciu systemu Maestro In Vivo Imaging System. **A.** Reprezentatywne zdjęcia wybranych organów, próbki osocza i kończyn dolnych - uzyskane dla myszy kontrolnych (K), którym podawano sól PBS, jak również myszy, od których izolowano narządy po 4 oraz 24h od LI. Zdjęcia wykonano w jasnym polu (BF), w zielonym kanale fluorescencji (GFP), jak również przedstawiono złożenie jasnego pola i zielonej fluorescencji

(BF/GFP). Czerwone strzałki wskazują uszkodzone kończyny. **B.** Analiza półilościowa retencji MSC-EVs w wybranych organach i osoczu. Wartości MFI dla poszczególnych organów przedstawiono w odniesieniu do wartości uzyskanych dla myszy grupy kontrolnej (PBS), dla których przyjęto, że procent wartości intensywności fluorescencji dla poszczególnych narządów wynosił 100%. **C.** Analiza ilościowa retencji MSC-EVs w kończynach dolnych. Na wykresie przedstawiono stosunek uzyskanych wartości MFI dla kończyny niedotlenionej do wartości uzyskanych dla kończyny zdrowej. Na wykresach czarną linią zaznaczono MFI dla myszy grupy kontrolnej (K). Wartości przedstawiają: Średnia $\pm$ SD, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. Sól PBS (test t-studenta), $N=3$ myszy/ grupę.

Podsumowując, po 4h od dożylnego podania MSC-EVs u zwierząt w modelu LI, pęcherzyki wykryto w następujących organach: wątrobie, nerkach i płucach. Co istotne z punktu widzenia aktywności MSC-EVs, przeprowadzone badania wykazały swoisty „tropizm” MSC-EVs do miejsca uszkodzenia tkankowego oraz ich retencję w uszkodzonych kończynach, co może być związane z oddziaływaniem tych cząsteczek z aktywowanym śródbłonkiem naczyńniowym w miejscu toczącego się stanu zapalnego, co było analizowane we wcześniejszych badaniach *in vitro*. Wydaje się zatem prawdopodobne, że MSC-EVs podane dożylnie w modelu LI, będą potencjalnie wpływały na regenerację niedotlenionych tkanek kończyny dzięki ich internalizacji do komórek docelowych i modulację funkcji tych komórek, a szczególnie w miejscu toczącego się procesu zapalnego towarzyszącego uszkodzeniu niedokrwiennemu, co zostało zbadane w dalszej części pracy.

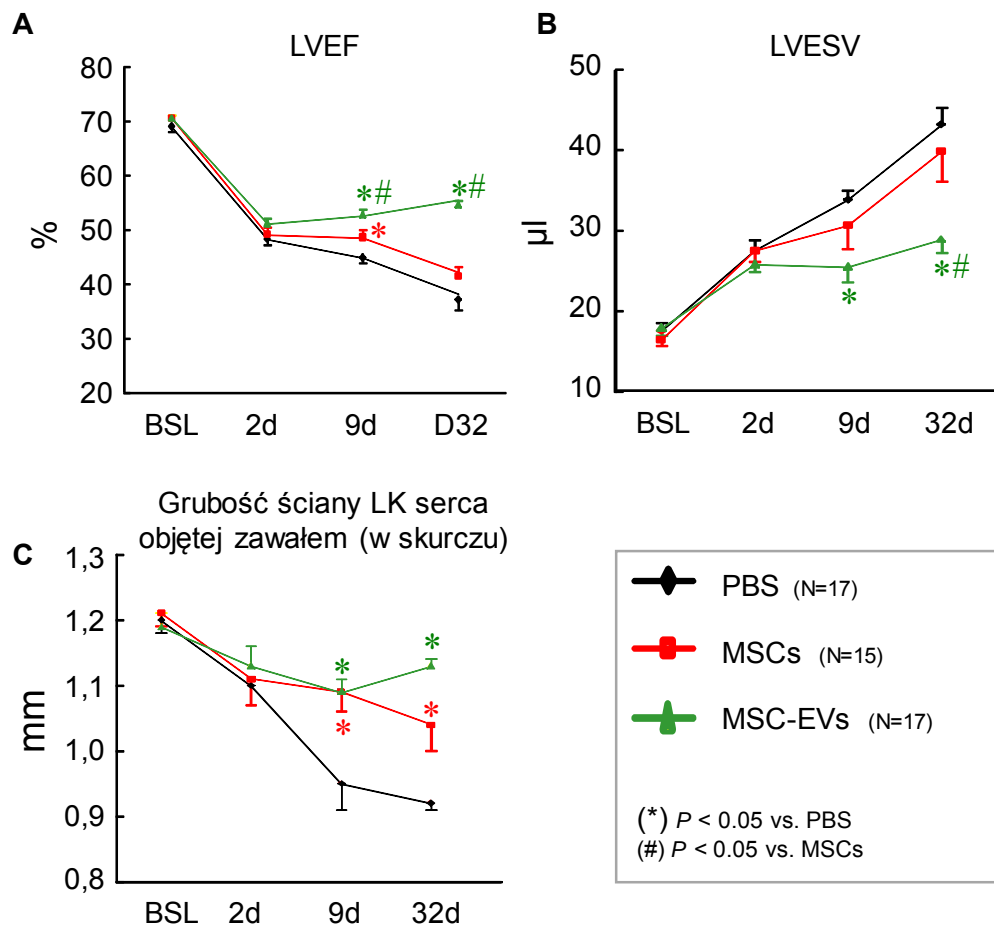
4.9. Ocena potencjału regeneracyjnego MSC-EVs oraz komórek MSCs w mysim modelu zawału mięśnia sercowego *in vivo*

Przeprowadzone badania składu molekularnego MSC-EVs oraz ich oddziaływania na komórki tkanek serca *in vitro* wykazały, że pęcherzyki te mogą przenosić bioaktywną zawartość do komórek śródbłonka, która może mieć potencjalny istotny wpływ na funkcje tych komórek istotne z punktu widzenia regeneracji uszkodzonych tkanek. Dlatego też, w następnym etapie pracy zbadano potencjał regeneracyjny MSC-EVs w mysim modelu zawału mięśnia sercowego (AMI). Wcześniejsze wyniki badania retencji podanych dożylnie MSC-EVs w tkankach zwierząt po zawale, nie wykazały znacznej akumulacji pęcherzyków w tkankach mięśnia sercowego, co sugeruje, że podobnie jak w przypadku przeszczepiania komórek, podania dożylnie są mniej efektywne od bezpośredniego podania miejscowego w przypadku uszkodzeń miokardium.

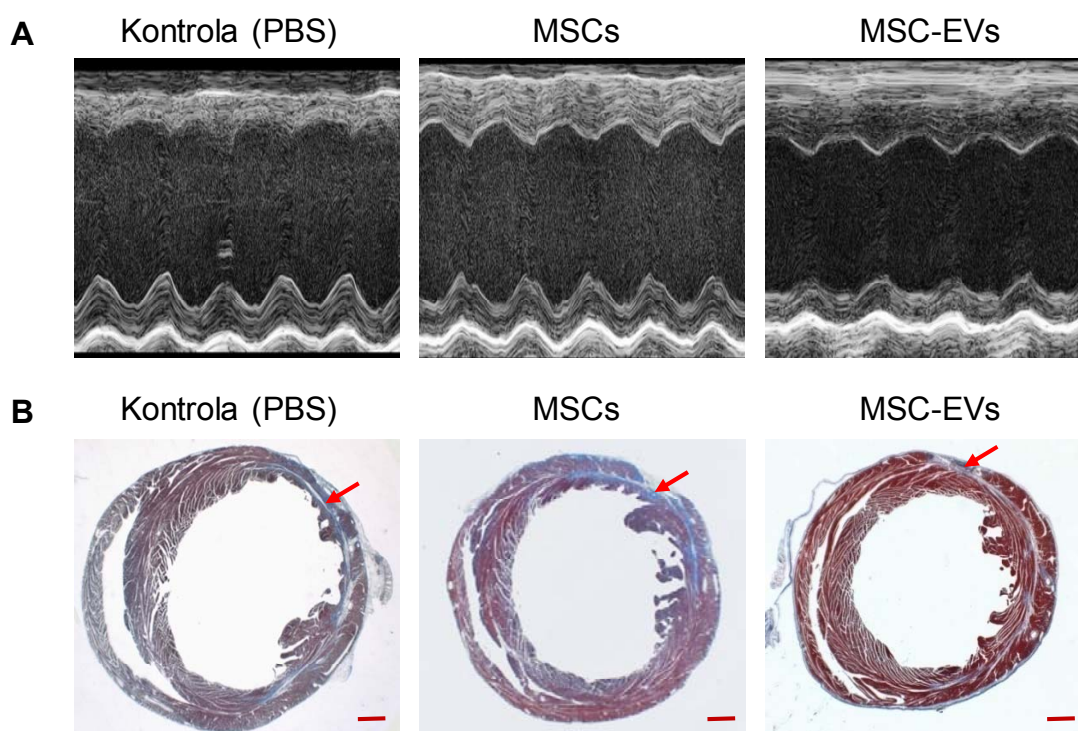
W badaniach potencjału regeneracyjnego, MSC-EVs podawane były zatem bezpośrednio do mięśnia sercowego w okolicę okołozawałową, po 2 dniach od ischemii/reperfuzji. W wybranych punktach czasowych - tj. bezpośrednio przed zabiegiem, po 2, 9 oraz 32 dniach od zabiegu AMI, myszy poddawane były badaniu echokardiograficznemu przy użyciu systemu Vevo 2100, celem oceny funkcji LK serca.

Ocena funkcji skurczowej LK serca wykazała istotny statystycznie wzrost frakcji wyrzutowej LK (ang. *LV ejection fraction*; LVEF) u myszy, którym podawano komórki MSCs oraz MSC-EVs w 9 dniu po zabiegu AMI (czyli w 7 dniu po przeszczepieniu preparatów terapeutycznych) - w porównaniu do myszy kontrolnych, którym podawano sam nośnik - roztwór soli PBS (Rycina 36A), co świadczy o poprawie funkcji serca u zwierząt traktowanych MSC-EVs lub komórkami MSCs. W tym samym punkcie czasowym, u myszy którym podawano preparat MSC-EVs obserwowano istotne statystycznie zmniejszenie objętości końcowo- skurczowej LK serca (ang. *LV end systolic volume*; LVESV) (Rycina 36B), co również potwierdza poprawę funkcji serca u tych zwierząt. Co istotne, w 32 dniu od AMI (czyli 30 dni po podaniu preparatów komórkowych lub MSC-EVs) frakcja wyrzutowa LK serca istotnie wzrosła w grupie zwierząt, którym przeszczepiono MSC-EVs – w porównaniu do myszy kontrolnych, którym podano nośnik (sól PBS) lub komórki MSCs (LVEF wynosiła w tym dniu ok. 55% u myszy którym podawano MSC-EVs vs. ok. 35% u myszy którym podawano nośnik vs. ok. 42% u myszy którym podawano komórki MSCs; Rycina 36A). W punkcie tym, objętość końcowo- skurczowa LK serca (LVESV) utrzymywała się na poziomie ok. 25 μ l w grupie zwierząt, którym podano MSC-EVs vs. 45 μ l w grupie zwierząt, którym podano nośnik - sól PBS oraz 40 μ l w grupie zwierząt, która otrzymała kontrolne komórki MSCs (Rycina 36B).

Otrzymane wyniki badań wykazały, że grubość ściany LK serca objętej zawałem mierzona podczas skurczu (ang. *infarct wall systolic diameter*) wzrosła w 32 dniu po zawale w grupie zwierząt, której podano MSC-EVs oraz komórki MSCs - w porównaniu do grupy kontrolnej zwierząt (Rycina 36C). Może to świadczyć o częściowym zahamowaniu niekorzystnych zmian histologicznych związanych z powstawaniem blizny pozawałowej i remodelingiem serca prowadzącym do zmniejszenia się grubości ściany LK powiązanej ze wzrostem objętości komory, co w efekcie prowadzi do upośledzenia funkcji całego organu. Obrazy uzyskane podczas badania echokardiograficznego wykazały, że u zwierząt grupy kontrolnej przednia ściana LK jest istotnie cieńsza niż w grupie zwierząt, której podano komórki MSCs oraz MSC-EVs (Rycina 37A). Obserwacje te zostały potwierdzone również na przekrojach poprzecznych serca wybarwionych metodą Massona (Rycina 37B).

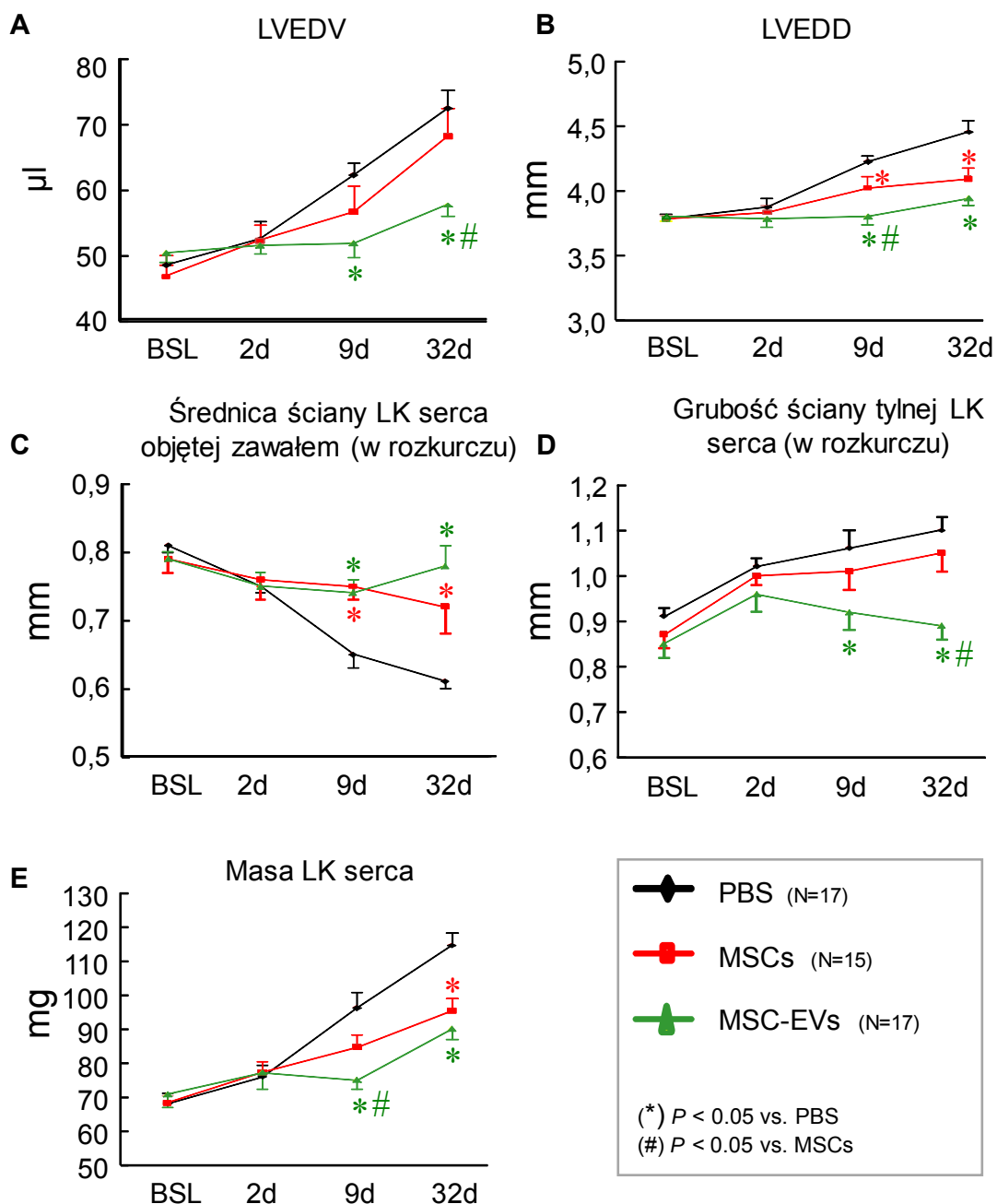


Rycina 36. Ocena wybranych parametrów funkcjonalnych lewej komory serca z zastosowaniem echokardiografii (ECHO). Badanie ECHO wykonano przed zabiegiem AMI (tzw. punkt BSL; ang. *baseline*), 2 dni (2d) po zabiegu - czyli w dniu podania preparatów biologicznych, jak również w 9 i 32 dniu po zabiegu AMI. **A.** LVEF – frakcja wyrzutowa lewej komory (LK) serca (ang. *left ventricle (LV) ejection fraction*). **B.** LVESV – objętość końcowo-skurczowa LK serca (ang. *LV end systolic volume*). **C.** Grubość ściany LK serca objętej zawałem w skurczu (ang. *infarct wall systolic diameter*). Wartości przedstawiają: Średnia $\pm$ SD, * $P < 0,05$ vs. PBS, # $P < 0,05$ vs. MSCs (test t-studenta), N=15-17 myszy/grupę.



Rycina 37. Reprezentatywne zdjęcia z badania echokardiograficznego oraz przekroje poprzeczne serca wybarwione metodą Massona. A. Reprezentatywne obrazy z badania echokardiograficznego wykonane podczas analizy serca w osi krótkiej w trybie M-mode przy użyciu systemu Vevo 2100. Na zdjęciach uwidoczniona jest ściana przednia oraz tylna LK. **B.** Reprezentatywne zdjęcia tkanek oraz anatomii serca na przekrojach poprzecznych serca. Barwienie wskazuje na obecność blizny łącznotkankowej utworzonej przez włókna kolagenowe (kolor niebieski) oraz żywego miokardium (kolor bordowy). Czerwone strzałki wskazują rejon blizny łącznotkankowej. Skala: 500 μ m.

Dalsza szczegółowa ocena parametrów funkcjonalnych i strukturalnych LK serca wykazała istotne statystycznie zmniejszenie końcowo- rozkurczowej objętości LK serca (ang. *LV end diastolic volume*; LVEDV) oraz końcowo- rozkurczowego wymiaru wewnętrznego LK serca (ang. *LV end diastolic diameter*; LVEDD) obserwowanych w 32 dniu po AMI u myszy, którym przeszczepiono dosercowo MSC-EVs - w porównaniu do myszy grupy kontrolnej (Rycina 38A, B). W aspekcie przebudowy tkanek serca, w tym samym punkcie czasowym - u myszy, którym podano MSC-EVs, obserwowano m.in. istotne zwiększenie grubości ściany LK serca objętej zawałem podczas rozkurczu (ang. *Infarct Wall Diastolic Diameter*), jak również zmniejszenie masy LK serca (ang. *LV Mass*) w porównaniu do grupy kontrolnej zwierząt, którym podano sól PBS (Rycina 38C-E).



Rycina 38. Ocena wybranych parametrów funkcjonalnych i strukturalnych lewej komory serca z zastosowaniem echokardiografii. Badanie ECHO wykonano przed zabiegiem AMI (tzw. punkt BSL; ang. *baseline*), 2 dni po zabiegu - czyli w dniu podania preparatów biologicznych, jak również w 9 i 32 dniu po zabiegu AMI. **A.** LVEDV- końcowo- rozkurczowa objętość LK serca (ang. *LV End-Diastolic Volume*). **B.** LVEDD – końcowo-rozkurczowy wymiar wewnętrzny (średnica) LK serca (ang. *LV end-diastolic diameter*). **C.** Średnica ściany LK serca objętej zawałem w rozkurczu (ang. *Infarct Wall Diastolic Diameter*). **D.** Grubość ściany tylnej LK serca w rozkurczu (ang. *Posterior Wall Thickness in Diastole*). **E.** Masa LK serca (ang. *LV Mass*). Wartości przedstawiają: Średnia $\pm$ SD, * $P < 0,05$ vs. PBS, # $P < 0,05$ vs. MSCs (test t-studenta), N=15-17 myszy/grupę.

Zaobserwowane zmiany histologiczne mogą świadczyć o zmniejszeniu niekorzystnej utraty miokardium towarzyszącej przebudowie tkanek serca po uszkodzeniu, jak również o zahamowaniu procesów remodelingu w przypadku zastosowania preparatów opartych o komórki MSCs, a w szczególności MSC-EVs.

Przeprowadzone badania w modelu AMI *in vivo* wykazały, że zarówno przeszczepienie komórek MSCs, jak i samych MSC-EVs, prowadzi do częściowego odwrócenia niekorzystnych procesów remodelingu, któremu podlega mięsień sercowy uszkodzony w wyniku niedotlenienia, co w efekcie przełożyło się na poprawę globalnej funkcji serca w obu grupach traktowanych preparatami biologicznymi – komórkami MSCs oraz MSC-EVs.

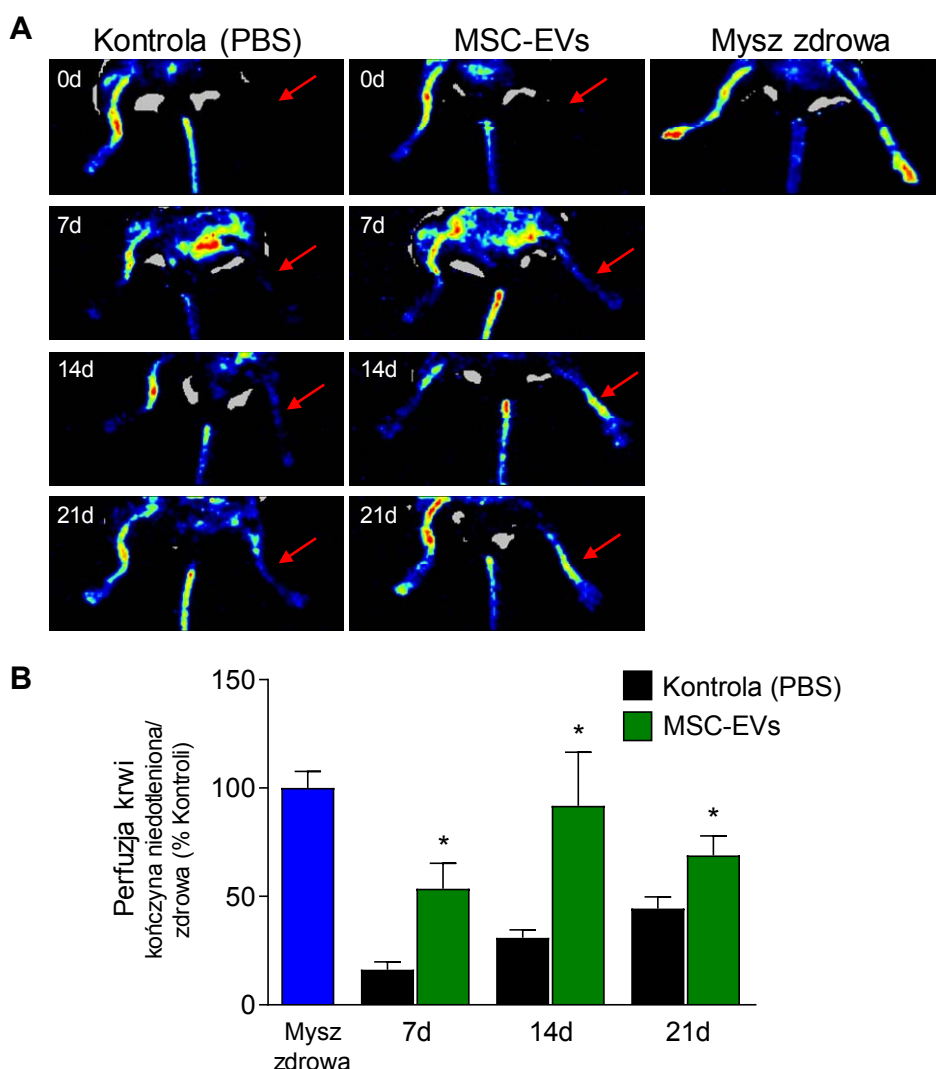
4.10. Ocena potencjału regeneracyjnego MSC-EVs w mysim modelu niedokrwienego uszkodzenia kończyny *in vivo*

Przeprowadzone badania retencji MSC-EVs w mysim modelu LI wykazały obecność tych cząsteczek w nerkach, płucach, wątrobie i śledzionie (w 4h od podania), jak również w niedokrwionych kończynach po ich dożylnym podaniu u myszy, co może świadczyć o tym, że tego typu podanie może prowadzić do efektywnego „zasiedlania” uszkodzonego obszaru kończyny przez pęcherzyki.

W związku z tym, w następnym etapie przeprowadzono badanie potencjału regeneracyjnego MSC-EVs w modelu niedokrwienego uszkodzenia kończyny u myszy, gdzie pęcherzyki podawano dożylnie celem długoterminowej obserwacji potencjalnych efektów promujących regenerację. Iniekcje pęcherzyków rozpoczęto w dniu zabiegu i wykonywano co trzy dni, aż do 18 dnia eksperymentu (eksperyment zakończono w 21 dniu). Tego typu schemat wielokrotnego podania MSC-EVs do krwioobiegu, zwiększał prawdopodobieństwo „zasiedlania” przez pęcherzyki uszkodzonych tkanek, co z kolei zwiększało prawdopodobieństwo efektu regeneracyjnego.

Wyniki przeprowadzonych badań, w tym analiza przepływu krwi w kończynach z zastosowaniem systemu Dopplera, wykazały istotny wzrost perfuzji krwi w niedotlenionych kończynach myszy, którym podawano preparaty MSC-EVs - już w 7 dniu od zabiegu, w porównaniu do myszy kontrolnych, którym podawano sól PBS. Perfuzja krwi wynosiła odpowiednio $53,6 \pm 28,5 \%$ dla myszy którym podawano MSC-EVs vs. $16,2 \pm 7,8\%$ dla myszy, którym podawano roztwór soli PBS - w odniesieniu do prawidłowego poziomu perfuzji w tkankach mierzonego indywidualnie dla każdego zwierzęcia przed wykonaniem zabiegu LI, dla którego przyjęto, że wynosi on 100% (Rycina 39A, B). W 14 dniu po zabiegu również obserwowano znamieny wzrost perfuzji niedotlenionych tkanek w grupie myszy, której przeszczepiono MSC-EVs ($91,8 \pm 42,7\%$), w odniesieniu do grupy kontrolnej ($30,9 \pm 6,6\%$) (Rycina 39B), co sugeruje efekt proangiogeny przeszczepionych MSC-EVs w niedotlenionych tkankach. Zaobserwowany wzrost przepływu krwi w niedotlenionych tkankach utrzymywał się na znamienne wyższym poziomie do 21 dnia eksperymentu w przypadku myszy, którym podano MSC-EVs ($68,9 \pm 17,9 \%$) w porównaniu do grupy kontrolnej ($44,4 \pm 10,7 \%$) (Rycina 39 B). W przypadku myszy kontrolnych, którym podawano roztwór kontrolny, w miarę upływu

czasu również obserwowano wzrost perfuzji krwi w uszkodzonych tkankach, który można tłumaczyć aktywacją endogennych mechanizmów naprawczych, w tym potencjalnie endogennych komórek progenitorowych uczestniczących w regeneracji uszkodzonych tkanek. Wartość perfuzji tkanek u myszy którym podawano preparat MSC-EVs w 21 dniu od zabiegu była nieznacznie niższa niż wartość perfuzji zmierzona w 14 dniu, co może prawdopodobnie wynikać z tego, że nie wszystkie nowopowstałe naczynia krwionośne dojrzewają oraz ulegają stabilizacji (utrwaleniu). Doniesienia literaturowe wskazują, że podanie preparatów opartych o komórki macierzyste w stanie kardiomiopatii niedokrwiennej, powoduje poprawę parametrów hemodynamicznych serca, jednak poprawa ta jest przejściowa (20), co może sugerować, że wielokrotne podania preparatów opartych o komórki macierzyste lub ich pochodne w dłuższych odstępach czasowych, mogą przynieść długotrwałą poprawę ocenianych parametrów. Nie mniej jednak, w każdym punkcie czasowym w przypadku myszy, którym podawano MSC-EVs, obserwowano statystycznie istotną, wyższą perfuzję tkanek niedotlenionej kończyny, w porównaniu do myszy grupy kontrolnej (Rycina 39A, B).



Rycina 39. Badanie perfuzji krwi w kończynach myszy poddanych zabiegowi LI z zastosowaniem systemu Doppler. Badanie wykonano przed zabiegiem LI (mysz zdrowa), bezpośrednio po zabiegu (0d) w celu sprawdzenia skuteczności przeprowadzonej okluzji naczynia, jak również w 7, 14 oraz 21d po zabiegu LI. **A.** Reprezentatywne zdjęcia z analizy perfuzji krwi w

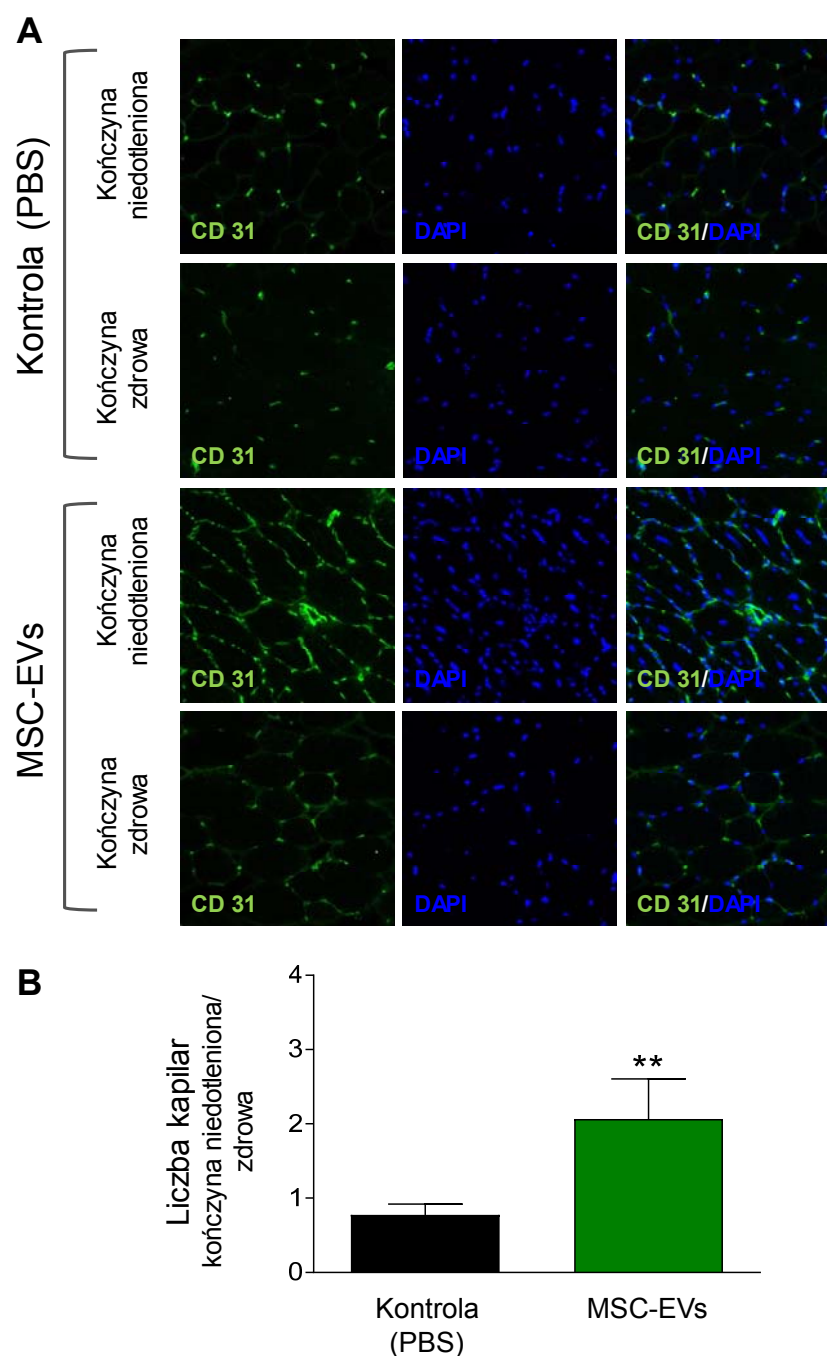
kończynach dla myszy, którym podawano MSC-EVs oraz kontrolnie sól PBS, a także dla myszy zdrowej. Czerwone strzałki wskazują niedotlenione kończyny. **B.** Analiza ilościowa perfuzji krwi w kończynach dolnych myszy. Dla każdego zwierzęcia bezpośrednio przed zabiegiem zmierzono perfuzję krwi w obu kończynach dolnych. Przyjęto, że stosunek wyjściowej perfuzji w kończynie lewej (tj. zdrowej, w której wykonano następnie zabieg niedotlenienia) do perfuzji w kończynie prawej (tj. zdrowej, która następnie nie była operowana dla kontroli) wynosi 100%. Wartość perfuzji w poszczególnych punktach czasowych przeliczano w odniesieniu do wartości procentowych dla poszczególnych zwierząt, analizowanych bezpośrednio przed zabiegiem. Wartości przedstawiają: Średnia $\pm$ SEM, * $P < 0,05$ vs. sól PBS (test t-studenta), $N=8$ (kontrola, PBS), $N=9$ (MSC-EVs).

W celu potwierdzenia wzrostu perfuzji krwi w niedotlenionych tkankach, która może być związana m.in. z powstawaniem krążenia obocznego, wykonano barwienia immunocytochemiczne tkanek mięśniowych pobranych od zwierząt po zakończeniu eksperymentu (w 21 dniu) w celu detekcji liczby naczyń krwionośnych w tych tkankach.

Przeprowadzone badania wykazały statystycznie istotny wyższy stosunek liczby kapilar w kończynie niedotlenionej do kończyny zdrowej w grupie zwierząt, którym podawano MSC-EVs w porównaniu do myszy grupy kontrolnej (PBS) (Rycina 40A, B). Wyższy stosunek liczby kapilar w grupie myszy, którym podawano MSC-EVs korelował z wyższą perfuzją tkanek obserwowaną w tej grupie zwierząt.

Uzyskane wyniki świadczą, że MSC-EVs podane dożylnie istotnie wpływają na poprawę perfuzji krwi w niedotlenionej kończynie, która koreluje z wyższą liczbą powstałych nowych naczyń krwionośnych w tych tkankach. Co ważniejsze, wykazano, że w tym modelu uszkodzenia podanie dożylnie stanowi efektywną drogę podania preparatów biologicznych.

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały istotny statystycznie wzrost perfuzji krwi w niedokrwionych kończynach myszy w grupie zwierząt, której podawano dożylnie MSC-EVs w porównaniu do grupy kontrolnej, której przeszczepiono roztwór kontrolny. Wzrost perfuzji tkanek jest skorelowany z wyższą liczbą kapilar w tych tkankach, co może być związane z powstawaniem krążenia obocznego, stymulowanego bioaktywną zawartością pęcherzyków z komórek MSCs podawanych u tych zwierząt.



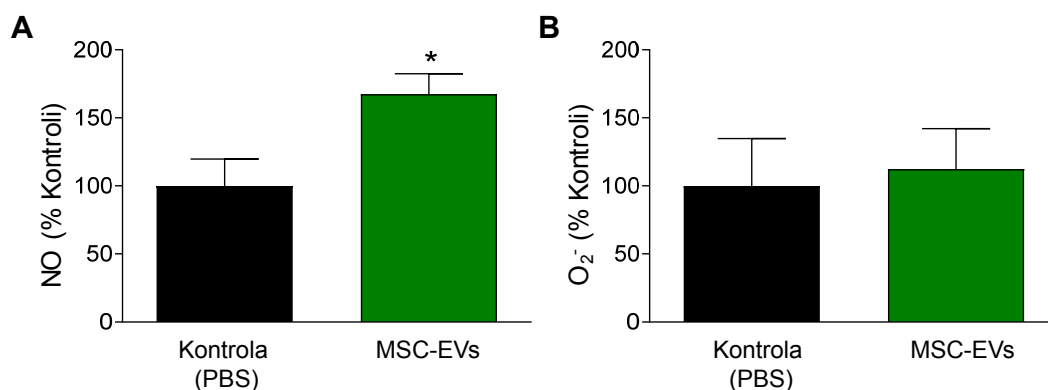
Rycina 40. Ocena liczby kapilar w tkankach mięśniowych w punkcie końcowym eksperymentu (21d) z zastosowaniem analizy immunohistochemicznej. A. Reprezentatywne zdjęcia skrawków tkanek mięśniowych wybarwionych: w kierunku obecności antygenu CD31 (marker komórek śródbłónka; kolor zielony), DAPI (bawienie jądrowe; kolor niebieski) oraz obraz złożenia sygnałów dla CD31 oraz DAPI. **B.** Analiza pólnościowa liczby kapilar w tkankach. Wynik przedstawiono jako stosunek liczby kapilar w kończynie niedotlenionej do liczby kapilar w kończynie zdrowej (analizowanych z tej samej powierzchni skrawków) - w dwóch grupach zwierząt, którym podano MSC-EVs lub kontrolnie sól PBS. Wartości przedstawiają: Średnia $\pm$ SEM, ** $P < 0,01$ vs. sól PBS (test U Manna-Whitneya), $N=5$ /grupę.

4.11. Analiza biochemiczna tkanek mięśniowych pobranych od myszy w modelu niedokrwiennego uszkodzenia kończyny *in vivo*

W 21 dniu od zabiegu LI, czyli w dniu zakończenia eksperymentu, od poszczególnych zwierząt pobrano także tkanki mięśniowe (z kończyn niedotlenionych oraz zdrowych) w celu przeprowadzenia wybranych analiz biochemicznych, które mogłyby wskazać na mechanizmy zaangażowane w proangiogenną aktywność MSC-EVs obserwowaną w tkankach po LI.

W pierwszej kolejności w pobranych tkankach zbadano poziom produkcji tlenu azotu (ang. *nitric oxide*, NO) oraz anionu nadadtlenkowego (ang. *superoxide anion*, O_2^-) techniką Elektronowego Rezonansu Paramagnetycznego (ang. *Electron paramagnetic resonanse*, EPR). NO pośredniczy w wielu procesach związanych z angiogenezą (228), natomiast wzrost produkcji reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS) wśród których zaliczyć można O_2^- może indukować stres oksydacyjny oraz powodować uszkodzenie cząstek lipidów, białek i DNA (229). Celem przeprowadzonej analizy było określenie na poziomie biochemicznym zjawisk zachodzących w tkankach pobranych od myszy w 21 dniu od uszkodzenia, tj. czy podanie MSC-EVs wpływa na wzrost wytwarzania NO (który korzystnie moduluje proces terapeutycznej angiogenezy) w uszkodzonych tkankach oraz równocześnie nie powoduje powstania wtórnego stanu zapalnego.

Przeprowadzone przez mnie badania EPR (w czasie stażu w INSERM U1063, Stress Oxydant et Pathologies Métaboliques, Institut de Biologie en Santé w Angers we Francji, w specjalistycznej Pracowni Spektroskopii EPR) wykazały znaczny wzrost produkcji NO w tkankach mięśniowych niedotlenionych kończyn w grupie zwierząt, którym podawano MSC-EVs - wynoszący $167,4 \pm 22,1$ % w odniesieniu do zwierząt grupy kontrolnej (którym podawano roztwór soli PBS), dla której przyjęto, że poziom NO w tkankach jest równy 100% (Rycina 41A). W dalszym etapie zbadano wytwarzanie O_2^- w tkankach mięśniowych w 21 dniu od zabiegu. W tym przypadku nie wykazano znaczącej produkcji tego anionorodnika w tkankach mięśniowych zwierząt, którym podawano MSC-EVs, w porównaniu do zwierząt kontrolnych, co może świadczyć, że same MSC-EVs nie indukują powstania wtórnego stanu zapalnego (Rycina 41B). Ma to istotne znaczenie z punktu widzenia ich potencjalnych przyszłych zastosowań w regeneracji uszkodzonych tkanek.



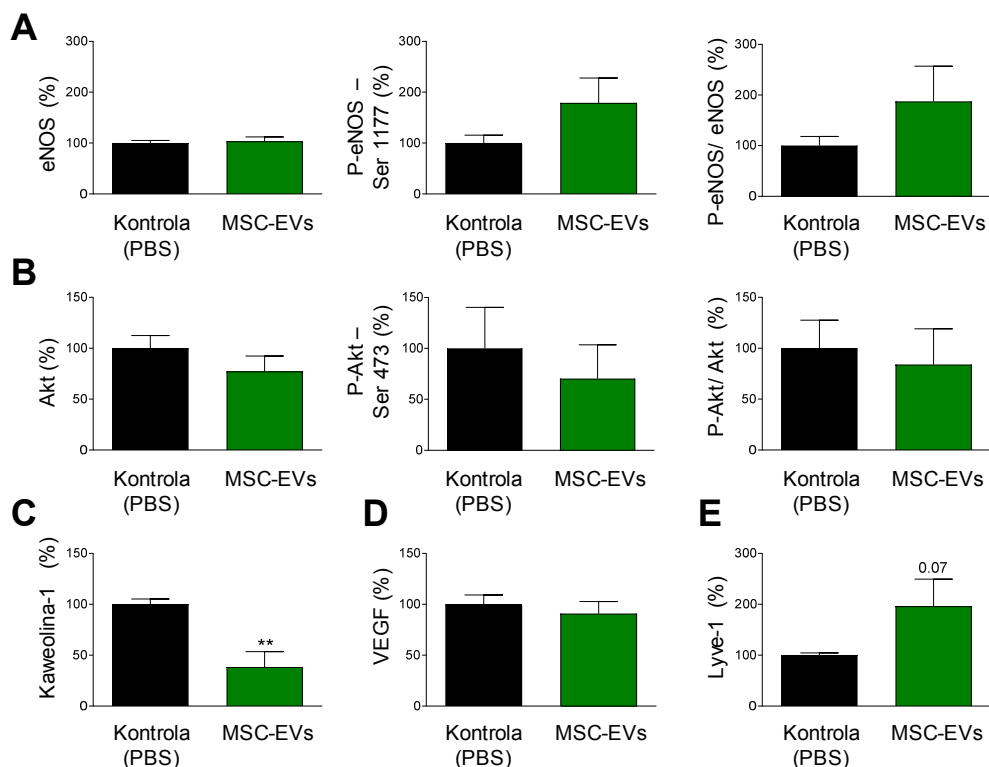
Rycina 41. Analiza poziomu NO oraz O₂⁻ w tkankach mięśniowych kończyn w punkcie końcowym eksperymentu (21d) z zastosowaniem techniki EPR. Poziom NO oraz O₂⁻ w mięśniach kończyny niedotlenionej w stosunku do kończyny zdrowej u zwierząt, którym podawano MSC-EVs - przedstawiono, jako procent wartości wyliczonej dla zwierząt kontrolnych (PBS). **A.** Poziom NO w tkankach mięśniowych kończyn dolnych myszy. **B.** Poziom O₂⁻ w tkankach mięśniowych kończyn dolnych myszy. Wartości przedstawiają: Średnia ± SEM, *P<0,05; sól PBS (test t-studenta), N=4/grupę.

W kolejnym etapie, wykorzystując metodę Western blot, wykonano analizę ekspresji wybranych białek w pobranych tkankach mięśniowych, takich jak m.in. białek enzymatycznych eNOS i Akt oraz ich form ufosforylowanych, kaweoliny-1, VEGF oraz Lyve-1, które mogą być potencjalnie zaangażowane w obserwowane procesy regeneracyjne zachodzące m.in. na drodze angiogenezy i limfangiogenezy w tkankach mięśniowych po przeszczepieniu MSC-EVs.

Przeprowadzone badania wykazały wzrost ekspresji formy ufosforylowanej białka eNOS (Ser 1177) w odniesieniu do jego całkowitej puli - w tkankach mięśniowych w grupie zwierząt, której podawano MSC-EVs. Wzrost ten wynosił 187,5 ± 104,0 %, w porównaniu do grupy kontrolnej zwierząt, w której poziom usforylowanej formy eNOS względem pełnej puli tego białka, przeliczono jako 100% (Rycina 42A). Zaobserwowano natomiast nieznaczny spadek ekspresji ufosforylowanej formy białka Akt (Ser 473) w stosunku do jego całkowitej ilości w badanych tkankach mięśniowych pobranych od myszy którym podawano MSC-EVs w odniesieniu do grupy kontrolnej zwierząt (Rycina 42B). Nieznaczny wzrost ekspresji ufosforylowanej formy białka eNOS był skorelowany ze spadkiem ekspresji kaweoliny-1 w tkankach pobranych z niedotlenionych kończyn myszy, którym podawano MSC-EVs w odniesieniu do myszy grupy kontrolnej (którym podawano roztwór soli PBS). Kaweolina-1 jest białkiem, które powoduje inaktywację cząsteczki eNOS, w rezultacie czego maleje produkcja NO (230). Wzrost ufosforylowanej formy białka eNOS, które bierze udział w produkcji NO, był skorelowany ze wzrostem poziomu NO w tkankach oraz spadkiem ekspresji kaweoliny-1, będącej blokerem ufosforylowanej formy białka eNOS.

Co interesujące, nie obserwowano natomiast wzrostu poziomu silnie proangiogenneo czynnika wzrostowego VEGF po podawaniu MSC-EVs. Ze względu na fakt, że analizę wykonano na tkankach pobranych od myszy w 21 dniu od zabiegu, nie można wykluczyć, że wzrost tego białka mógł wystąpić we wcześniejszych punktach doświadczalnych. Co ciekawe, wykazano nieznaczny wzrost ekspresji białka Lyve-1, które

uczestniczy w procesach limfangiogenezy. Choć pojawiło się doniesienie naukowe mówiące o udziale limfangiogenezy w procesie regeneracji skóry (231), wciąż niewiele wiadomo o jej udziale w regeneracji niedotlenionych tkanek.



Rycina 42. Analiza ekspresji wybranych białek związanych z angiogenezą oraz limfangiogenezą w tkankach mięśniowych w punkcie końcowym eksperymentu (21d) metodą Western blot. A-E. Poziom ekspresji poszczególnych badanych białek w próbkach pobranych od zwierząt kontrolnych (PBS) oraz zwierząt, którym podano MSC-EVs. W analizie wykorzystano kontrolę endogenną - β -aktynę do której normalizowano wartości ekspresji dla poszczególnych białek. Wyniki przedstawiono jako stosunek ekspresji wybranego białka w mięśniach kończyny niedotlenionej do kończyny zdrowej. Dla myszy, którym podawano PBS (Kontrola) przyjęto, że stosunek ten jest równy 100%. Poziom ekspresji każdego białka w mięśniach grupy badanej (MSC-EVs) odniesiono do zwierząt kontrolnych (% Kontrola). Wartości przedstawiają: Średnia $\pm$ SEM, ** $P < 0,01$ vs. sól PBS (test t-studenta), $N = 5$ /grupę.

Podsumowując, wykonane badania potwierdziły wyższą produkcję NO w tkankach pobranych z niedotlenionych kończyn myszy w odniesieniu do tkanek kończyn zdrowych oraz w odniesieniu do tkanek zwierząt grupy kontrolnej, która koreluje z wyższą ekspresję ufosforylowanej formy białka eNOS oraz niższą ekspresję kaweoliny-1, co świadczy o aktywacji procesów angiogennych w tkankach na skutek podania MSC-EVs. Co więcej, wydaje się wysoce prawdopodobne, że oprócz terapeutycznej angiogenezy, w tkankach zachodzi także limfangiogeneza, co wymaga dalszych badań, które są w tej chwili prowadzone we współpracy z wspomnianym ośrodkiem we Francji. Nie obserwowano wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu w grupie myszy, której podawano MSC-EVs w odniesieniu do grupy kontrolnej zwierząt, co świadczy, że samo podanie MSC-EVs nie powoduje dodatkowego stanu zapalnego w tkankach.

5. DYSKUSJA

Komórki macierzyste (KM) od lat stanowią przedmiot szeregu badań o charakterze podstawowym oraz przeklinicznym, których celem jest m.in. poznanie biologii i mechanizmów działania tych komórek w odbudowie tkankowej, co daje nadzieje na efektywne praktyczne ich zastosowania w regeneracji uszkodzonych tkanek i narządów.

Dotychczasowe wyniki badań światowych wskazują, że jednym z kluczowych mechanizmów, na drodze którego KM – w szczególności komórki MSCs, wywierają swój efekt regeneracyjny jest ich aktywność parakrynną, związana z wydzielaniem szeregu bioaktywnych związków mających bezpośredni efekt na komórki endogenne w miejscu uszkodzenia (114,124,191–196). W warunkach fizjologicznych, jak i po aktywacji, komórki zwierzęce, w tym komórki macierzyste, wydzielają bezpośrednio do środowiska szereg bioaktywnych cząsteczek, w tym m.in. cytokiny, czynniki wzrostu, a także uwalniają pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. *Extracellular Vesicles*, EVs) (124–126).

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe stanowią sferyczne, obłonione struktury złuszczone zarówno z powierzchni komórek, jak również uwalniane z wnętrza komórki, które są nośnikami bioaktywnych cząsteczek takich jak m.in: receptory błonowe, białka błonowe i wewnątrzkomórkowe, mRNA, miRNA, lncRNA oraz lipidy, dzięki czemu EVs odgrywają istotną rolę w komunikacji międzykomórkowej, zapewniając wymianę bioaktywnych związków pomiędzy komórkami - określanymi często jako komórki donorowe, oraz komórki akceptorowe, bądź docelowe (105,114,145,176,190,232,233). Transfer bioaktywnych związków przez EVs, niesie określony efekt biologiczny w postaci modyfikacji funkcjonalnej w komórce docelowej (105,114).

Dziś rosnąca liczba doniesień z badań światowych wskazuje, że również EVs wydzielane przez komórki macierzyste odpowiadają za modulację aktywności funkcjonalnej w innych komórkach, w tym w endogennych komórkach somatycznych, progenitorowych i macierzystych rezydujących w tkankach i narządach, co może mieć istotne znaczenie m.in. w stymulacji endogennych mechanizmów naprawczych w tkankach (113,114,194–196). Szczególną populacją KM, której przypisuje się szerokie spektrum aktywności parakrynną są mezenchymalne/ stromalne komórki macierzyste KM (ang. *Mesenchymal Stem/ Stromal Cells*, MSCs) (126,234). Ze względu na wspomnianą aktywność wydzielniczą, a także inne istotne cechy, jakie wykazują komórki MSCs, jako komórkowy materiał przeszczepowy, są one dziś najczęściej optymalizowaną i stosowaną populacją KM w próbach leczenia uszkodzeń tkankowych, w tym również w próbach klinicznych u pacjentów (113,235–239).

Głównym celem badań w ramach niniejszej pracy doktorskiej była poszerzona analiza składu molekularnego oraz potencjału biologicznego i regeneracyjnego EVs wydzielanych przez mysie komórki MSCs szpiku kostnego (czyli tzw. MSC-EVs), która pozwoliłaby odpowiedzieć na pytanie o potencjalne przyszłe możliwości zastosowań preparatów MSC-EVs w leczeniu uszkodzeń tkankowych wywołanych niedotlenieniem. W tym celu, w ramach niniejszej pracy przeprowadzono szereg badań molekularnych składu MSC-EVs oraz ich aktywności biologicznej w warunkach *in vitro*, jak również potencjału

regeneracyjnego *in vivo*, w tym w unikatowym modelu ostrego uszkodzenia mięśnia sercowego po ischemii- reperfuzji u myszy (AMI) oraz w mysim modelu niedotlenienia kończyny (LI).

Komórki MSCs oraz MSC-EVs

Komórki macierzyste szpiku kostnego stanowią heterogenną frakcję komórek, wśród których występują m.in. krwiotwórcze komórki macierzyste (ang. *hematopoietic stem cells*, HSCs), komórki progenitorowe śródbłonka (ang. *endothelial progenitor cells*, EPCs) oraz komórki MSCs (113,240–242).

Komórki MSCs izoluje się powszechnie z różnych tkanek, w tym tkanek szpiku kostnego poprzez ich zdolność do adhezji do polistyrenowych powierzchni naczyń hodowlanych (199,243). W niniejszej pracy, hodowlę adherentnej frakcji szpikowych komórek mysich prowadzono przez kilka cykli pasaży (do pasażu 4-6) celem wzbogacenia tej frakcji w komórki MSCs, co jest związane ze stopniowym zanikaniem w długoterminowej hodowli komórek o fenotypie hematopoetycznym (244). Komórki poddane takiej długoterminowej ekspansji *in vitro*, poddano charakterystyce fenotypowej oraz funkcjonalnej w celu potwierdzenia ich tożsamości, jako komórek MSCs, zgodnie z kryteriami objętymi w zaleceniach Międzynarodowego Towarzystwa Terapii Komórkowej (ISCT) – wydanymi w celu właściwej identyfikacji komórek MSCs w różnych tkankach (79). W związku z tym, że wytyczne ISCT obejmują kryteria identyfikacji ludzkich komórek MSCs (79) oraz nie ma w literaturze zdefiniowanych zbiorczo kryteriów charakteryzujących mysie komórki MSCs, w celu określenia tożsamości izolowanych w niniejszej pracy komórek szpikowych, zaimplementowano kryteria identyfikacji rekomendowane przez ISCT w możliwie jak najwyższym stopniu. Wykazano, że komórki MSCs mysiego szpiku kostnego wyizolowane i wykorzystane w niniejszej pracy, wykazują zdolność do adhezji do powierzchni naczyń hodowlanych, natomiast poszerzona analiza profilu antygenowego (obejmującego m.in. wybrane markery pozytywne i negatywne komórek MSCs według zaleceń ISCT) wykazała ekspresję następujących antygenów powierzchniowych: CD29, CD44, CD90, CD105, Sca-1, CD309 (VEGFR2), CD63, CD81, CD106, CD98 przy równoczesnym braku antygenów: CD45, SSEA-1, c-kit, CD31, CD62E, CD11b, TCR- β , CD45R, TCR- $\gamma\delta$, CD184. Nieznacznym odsetkiem tych komórek posiada na swojej powierzchni antygeny: CD202b, CD11a/CD18, CD54 oraz CD62P. Zbadany przeze mnie fenotyp otrzymanych komórek odpowiada fenotypowi komórek MSCs, definiowanemu dla komórek ludzkich.

W niniejszej pracy zaobserwowano jednak, że odsetek mysich komórek MSCs pozytywnych pod względem ekspresji antygenów CD73, CD90, CD105 jest niższy niż w przypadku rekomendacji opublikowanych dla ludzkich komórek MSCs, co może wynikać z różnicy międzygatunkowej oraz potencjalnie innej kinetyki ekspansji właściwej populacji komórek MSCs w hodowlach *in vitro* komórek ludzkich oraz mysich. W przypadku ludzkich komórek MSCs, już w krótkoterminowej hodowli (po pierwszym pasażu) zdecydowana większość komórek (prawie 100%) nie wykazuje ekspresji antygeny CD45 (243). Tymczasem w przypadku mysich komórek MSCs, odsetek komórek CD45-negatywnych wynosił ok. 95% dopiero na pasażu 4 (doświadczenie własne). Zanikanie

komórek o fenotypie hematopoetycznym, w tym komórek CD45⁺/CD11b⁺ (reprezentujących głównie linię monocytarno-makrofagową), w miarę postępu hodowli komórek adherentnych mysiego szpiku kostnego, stanowi alternatywę dla usuwania tych komórek na drodze sortowania magnetycznego (82) oraz minimalizuje ryzyko utraty właściwych komórek MSCs lub ich przypadkowej dekontaminacji podczas kolejnych etapów selekcji. Procedurę obejmującą stopniowe wzbogacanie hodowli w komórki MSCs w miarę trwania ekspansji frakcji adherentnej komórek mysiego szpiku kostnego, stosowałam również z sukcesem w celu izolacji i ekspansji komórek MSCs, które użyłam dla innych celów badawczych (245).

Z doświadczenia własnego, nabytego podczas pracy w Zakładzie Biologii Komórki WBBiB UJ w Krakowie, wynika, że sortowanie magnetyczne (tzw. metoda MACS) - będące jak dotąd jedyną metodą sortowania komórek dopuszczoną dla izolacji komórek dla zastosowań klinicznych (246) - jest techniką umożliwiającą jedynie wstępne wzbogacenie pożądaných frakcji komórkowych, ale nie zapewnia preparatów o bardzo wysokiej czystości, co możliwe jest dopiero dzięki zastosowaniu metody sortowania w oparciu o fluorescencję (FACS) (247,248).

W kolejnym etapie, komórki MSCs poddano hodowlom różnicującym w kierunku osteoblastów, chondrocytów i adipocytów przy użyciu komercyjnie dostępnych pożywek hodowlanych dedykowanych do hodowli różnicującej komórek mysich. Potwierdzono zdolność komórek MSCs do różnicowania w w/w komórki pochodzenia mezodermalnego, potwierdzającym tym samym ich charakter multipotencjalny. Przeprowadzone w tej części pracy badania odnośnie fenotypu komórek MSCs - stosowanych, jako komórki wyjściowe dla późniejszych izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych - potwierdziły tożsamość tych komórek, jako MSCs, zgodnie z zaleceniami Międzynarodowego Towarzystwa Terapii Komórkowej (79) zaadoptowanymi dla komórek pochodzenia mysiego.

W celu izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z komórek MSCs, czyli preparatów MSC-EVs, pożywka kondycjonowana była zbierana znad komórek MSCs po całodobowej ich inkubacji w pożywce bezsurowiczej, ale suplementowanej albuminą bydlęcą (0,5% BSA) celem zachowania funkcji i żywotności komórek. Zastosowana metoda zmiany pełnej pożywki hodowlanej zawierającej najczęściej surowicę bydlęcą (FBS) na pożywkę bezsurowiczą, jest procedurą stosowaną przez liczne grupy badawcze pracujące z EVs, a także praktyką zalecaną przez ISEV w celu standardyzacji metod izolacji pożywek kondycjonowanych dla celów pozyskiwania EVs (126,167). Można znaleźć doniesienia naukowe wskazujące, że EVs izolowane są także z pożywek niesuplementowanych innymi białkami oraz bez dodatku czynników wzrostu (249–251). Obecność surowicy w pożywce hodowlanej jest bowiem źródłem egzogennych EVs i stanowi swego rodzaju zanieczyszczenie układu nanocząstkami nie pochodzącymi z badanych komórek (252). W związku z powyższym, w celu izolacji EVs z hodowli komórkowych, zaleca się albo stosowanie pożywek bezsurowiczych, bądź pożywek surowiczych, ale wcześniej pozbawionych nanocząstek poprzez dodatkowe procesowanie (167). Doniesienia naukowe wskazują także, że komórki ssacze hodowane w pożywce suplementowanej surowicą pozbawioną endogennych EVs, wykazują obniżone tempo proliferacji (252).

Dodatkową zaletą zastosowania w niniejszej pracy pożywki bezsurowiczej w celu izolacji MSC-EVs (tj. pożywki uboższej, gdzie większość składników odżywczych pochodzenia surowiczego zastąpiono jednym białkiem - albuminą) jest potencjalna możliwość pozyskania EVs o zwiększonej zawartości czynników proangiogennych. Wyniki badań światowych wskazują bowiem, że EVs izolowane z pożywek kondycjonowanych zebranych z hodowli komórek prowadzonych w warunkach hipoksji oraz ograniczonego stężenia substancji odżywczych, wykazują wzbogacenie w białka związane z aktywacją szlaków angiogenezy, w tym szlaku od receptorów EGF, FGF, PDGF (190). Żywotność mysich komórek MSCs po zebraniu bezsurowiczych pożywek kondycjonowanych - zbadana w niniejszej pracy - wynosiła $87,9 \pm 4,6\%$ i wartość ta jest zbliżona od wartości opisywanych w literaturze, jako typowe dla tego typu preparatyki, w tym np. wartości $86,0 \pm 0,5\%$ żywych komórek MSCs, którą uzyskiwali w podobnych warunkach *Collino i wsp.* (126). Komórki MSCs, z hodowli których zbierano pożywki kondycjonowane do izolacji MSC-EVs, znajdowały się głównie w fazie G0/G1 cyklu komórkowego i nie obserwowano zaburzeń w przebiegu ich cyklu komórkowego w porównaniu do komórek hodowanych w standardowej, pełnej pożywce hodowlanej zawierającej surowicę bydlęcą.

MSC-EVs otrzymywano w niniejszej pracy z pożywek kondycjonowanych na drodze sekwencyjnego wirowania obejmującego dwa cykle ultrawirowania (z przyspieszeniem 100 000xg). Ultrawirowanie jest jedną z najszerzej stosowanych metod izolacji EVs, proponowaną również przez ISEV (167). W odniesieniu do innych metod izolacji EVs wzbogacających izolowane frakcje w egzosomy (np. izolacja w gradiencie gęstości *OptiPrep* lub przy użyciu odczynnika *ExoQuick* czy też odczynnika *Total Exosome Isolation*), metoda sekwencyjnego wirowania z ultrawirowaniem cechuje się stosunkowo wysoką wydajnością izolacji EVs, wzbogaceniem w obie frakcje EVs (egzosomy i ektosomy), a pozyskiwane preparaty posiadają stosunkowo niewielkie zanieczyszczenie innymi białkami (253). Co więcej, badania wskazują, że odzysk RNA z preparatów EVs otrzymanych na drodze ultrawirowania jest najwyższy, co może świadczyć, że metoda ta umożliwia izolację integralnych (nienaruszonych) pęcherzyków (253). Wysoki odzysk RNA z preparatów EVs uzyskanych na drodze ultrawirowania jest także zaletą biorąc pod uwagę niskie stężenie RNA obserwowane wyjściowo w pęcherzykach produkowanych przez komórki MSCs, w porównaniu z EVs pochodzącymi z innych typów KM (145,254). Z badań naszego zespołu wynika, że komórki MSCs produkują EVs o znacznie niższej zawartości RNA niż np. komórki iPSCs (114). Zatem również w niniejszej pracy doktorskiej zastosowano protokół sekwencyjnego wirowania z ultrawirowaniem, który z naszych doświadczeń stanowi jak dotąd optymalną procedurę izolacji EVs, szczególnie z komórek MSCs.

W kolejnym etapie, zgodnie z zaleceniami towarzystwa ISEV (166), w celu potwierdzenia obecności integralnych pęcherzyków w izolowanych próbkach MSC-EVs oraz w celu oceny ich morfologii, próbki MSC-EVs obrazowano techniką mikroskopii sił atomowych (AFM). Uzyskane wyniki wykazały, że badane próbki zawierają nanocząstki o kulistym kształcie i zróżnicowanej wielkości - typowej dla frakcji ektosomów i egzosomów (114). W odróżnieniu od transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM),

metoda obrazowania AFM umożliwia wizualizację preparatów w czasie rzeczywistym oraz nie wymaga etapu utrwalania analizowanego materiału, co znacznie zmniejsza ryzyko zniekształcania pęcherzyków podczas przygotowania preparatów do obrazowania.

Wykorzystana w pracy metoda izolacji MSC-EVs na drodze sekwencyjnego wirowania obejmującego dwa cykle ultrawirowania umożliwia otrzymanie heterogennych preparatów EVs składających się z większych ektosomów oraz mniejszych egzosomów. W celu wizualizacji heterogenności MSC-EVs, wykonano dodatkowo badania rozkładu wielkości tych nanocząstek przy użyciu systemu IZON qNano, który stanowi jedną z platform analitycznych stosowanych dziś do analiz wielkości nanocząstek (255,256). Przeprowadzona analiza wykazała, że MSC-EVs mieszczą się w zakresie wielkości 70 - 420 nm, a średnia wielkość tych nanocząstek wynosi $172,3 \pm 14,1$ nm przy dominującej populacji o wielkości $138,0 \pm 14,7$ nm. Wielkość otrzymanych cząstek jest porównywalna do średniej wielkości EVs izolowanych przez innych badaczy z hodowli komórek MSCs, w tym pochodzących z galarety Whartona, gdzie wynosiła pomiędzy $163,0 \pm 1,4$ nm, a $181,0 \pm 25,5$ nm, w zależności od rodzaju pożywki hodowlanej zastosowanej w badaniach (257).

Wyizolowane MSC-EVs wykazywały ekspresję synteniny-1 - charakterystycznej dla pęcherzyków oraz nie zawierały białka kalneksyny - białka związanego z siateczką śródplazmatyczną, które odróżnia preparaty EVs od preparatów komórkowych (166). Dodatkowo, preparaty MSC-EVs badane w niniejszej pracy, wykazywały wzbogacenie w egzosomy o czym świadczy m.in. obecność tetraspaniny CD9, która jest powszechnie uznawana za jeden z głównych markerów egzosomów (166). Biorąc pod uwagę listę 100 białek najczęściej identyfikowanych w egzosomach dostępnej na stronie internetowej ExoCarta (stanowiącej kompendium wiedzy na temat bioaktywnej zawartości egzosomów (143)), wykazałam, że preparaty MSC-EVs izolowane dla badań objętych niniejszą pracą, zawierają aż 82 białka z tej listy, co jednoznacznie potwierdza wzbogacenie preparatów MSC-EVs w egzosomy. Przeprowadzona analiza białek zidentyfikowanych w MSC-EVs w kontekście minimalnych kryteriów identyfikacji EVs opublikowanych przez ISEV (166), pozwoliła także potwierdzić, że otrzymane przeze mnie preparaty MSC-EVs przenoszą trzy grupy białek charakterystycznych dla pęcherzyków, takich jak: białka błonowe (np. CD9, CD63, CD81, integryny), białka cytoplazmatyczne (np. syntenina-1, aneksyna A1, A6, A11) oraz białka pozakomórkowe (np. fibronektyna), przy równoczesnym braku białek wewnątrzkomórkowych charakterystycznych dla określonych organelli (np. kalneksyny).

Analiza markerów powierzchniowych MSC-EVs wykonana przy użyciu wysokorozdzielczego cytometru przepływowego Apogee A50 dedykowanego do analizy małych obiektów wykazała występowanie na powierzchni badanych nanocząstek następujących antygenów: CD29, CD44, CD81, CD90, CD309 (receptor dla VEGF) oraz Sca-1, co potwierdza także obserwacje innych grup, że pęcherzyki - w tym przypadku głównie ektosomy - przenoszą receptory i inne cząsteczki błonowe, typowe dla komórek rodzicielskich (151,152). Ligandem dla antygeny CD44 jest m.in. hialuronian występujący m.in. na powierzchni komórek śródbłonna (258), co może istotnie wpływać na oddziaływanie MSC-EVs z tymi komórkami. Biorąc pod uwagę obecność receptora dla

VEGF na powierzchni MSC-EVs oraz mechanizmy działania EVs na komórki docelowe opisywane przez różne grupy badaczy (172,254), wydaje się wysoce prawdopodobne, że MSC-EVs mogą przenosić receptor dla VEGF do komórki akceptorowej, a przez to umożliwiać lub zwiększać aktywację sygnałowania od VEGF w komórkach docelowych, prowadzącego do stymulacji procesów angiogennych. Występowanie antygenów CD29, CD44, CD90 oraz Sca-1 potwierdza wzbogacenie MSC-EVs w ektosomy posiadające markery komórek rodzicielskich (249,251). Z kolei antygen CD81 również obecny na błonie części MSC-EVs, według dotychczasowego stanu wiedzy, jest charakterystyczny dla egzosomów (166).

Biorąc pod uwagę, że znaczny odsetek komórek MSCs ekspresjonuje tetraspaniny CD63 i CD81 na swojej powierzchni (co wykazano także w niniejszej pracy), można przypuszczać, że tetraspaniny nie są unikatowymi markerami jedynie egzosomów, ponieważ mogą także występować na większych ektosomach złuszczanych z powierzchni błony komórkowej. Obserwacja taka została także poczyniona przez inne grupy badawcze (142) i w tej chwili w środowisku toczy się dyskusja odnośnie właściwego opisywania frakcji EVs przenoszących tetraspaniny, które nie ograniczałby się jedynie do egzosomów, ale także ektosomów (*doniesienia własne Zespołu na podstawie udziału w spotkaniach organizowanych przez ISEV*).

W celu analizy bioaktywnego ładunku przenieszonego przez MSC-EVs, wykonano globalną analizę proteomiczną, a następnie badanie transkryptomu otrzymanych preparatów MSC-EVs, z szczególnym uwzględnieniem transkryptów miRNA oraz wybranych mRNA. W przeprowadzonych w niniejszej pracy badaniach zidentyfikowano 3920 białek wspólnych dla komórek MSCs oraz 818 białek wspólnych obecnych w preparatach MSC-EVs. Co więcej, w komórkach MSCs zidentyfikowano 2893 tzw. białka różnicowe, których nie zidentyfikowano w MSC-EVs, prawdopodobnie ze względu na brak ich obecności lub zbyt niskie stężenie w pęcherzykach - poniżej progu detekcji stosowanej metody. Co ciekawe, w nanocząstkach MSC-EVs zidentyfikowano 135 białek unikalnych dla nich, które były poniżej progu detekcji w komórkach MSCs. Są to prawdopodobnie białka, które ulegają zagęszczeniu w pęcherzykach, dzięki aktywnym mechanizmom pakującym, co było już wcześniej obserwowane także przez innych badaczy (259). Przypuszczalnie białka te albo stanowią frakcję cząsteczek usuwaną lub eksportowaną z komórek w danym momencie aktywności metabolicznej komórki, albo stanowią frakcję cząsteczek istotną z punktu widzenia komunikacji międzykomórkowej (260).

Porównanie kompozycji molekularnej MSC-EVs oraz komórek wyjściowych, z których one pochodzą (MSCs), może dostarczyć cennych informacji dotyczących potencjalnego wpływu tych nanocząstek na komórki docelowe. Białka unikatowe oraz wspólne analizowano w niniejszej pracy przy użyciu aplikacji Gene Ontology, biorąc pod uwagę szczególnie ich potencjalne zaangażowanie w różne procesy biologiczne zachodzące w komórce, funkcje molekularne tych białek oraz ich lokalizację pod względem przedziału komórkowego, z którego pochodzą. Biorąc pod uwagę kryterium podziału pod kątem procesów biologicznych, w których zidentyfikowane białka mogą uczestniczyć, zaobserwowałam wzbogacenie MSC-EVs w białka zaangażowane w

morfogenezę i rozwój struktur anatomicznych oraz organów, odpowiedź na bodźce chemiczne, sygnały zewnątrzkomórkowe oraz uszkodzenie, komunikację międzykomórkową i przekazywanie sygnałów oraz adhezję komórek. W komórkach MSCs poziom tych białek był niższy niż w pęcherzykach. Z kolei komórki MSCs wykazują wzbogacenie m.in. w białka zaangażowane w transkrypcję i regulację ekspresji genów, czy też metabolizm RNA, które to białka występują w MSC-EVs w niewielkiej ilości.

Co ciekawe, białka unikatowe zidentyfikowane w MSC-EVs, czyli występujące w wysokim stężeniu, mogą być z kolei zaangażowane nie tylko w morfogenezę oraz rozwój struktur anatomicznych, organów i organizmu wielokomórkowego, ale również w gojenie się ran/ uszkodzeń, odpowiedź na bodźce chemiczne i uszkodzenie, a także komunikację międzykomórkową i adhezję komórek. Ze względu na zaangażowanie białek unikatowych przenoszonych w MSC-EVs w w/w procesach, a szczególnie w odpowiedź na uszkodzenie oraz gojenie się ran, można przypuszczać, że MSC-EVs mogą być zaangażowane w procesy regeneracji uszkodzonych tkanek po ich przeszczepieniu. Potwierdza to rosnąca liczba doniesień z różnych laboratoriów światowych, wskazujących na potencjał regeneracyjny pęcherzyków pochodzących z komórek MSCs w regeneracji różnych tkanek (124,191–194,196).

Białka występujące w MSC-EVs pełnią także funkcje sygnałowe, uczestnicząc m.in. w wiązaniu jonów i receptorów oraz same stanowiąc przekaźniki sygnałów. Co więcej, analiza typu *Panther Pathways* biorąca pod uwagę białka zidentyfikowane w MSC-EVs wykazała, że białka te mogą być zaangażowane m.in. w szlaki sygnałowania takie jak szlak integrynowy, szlaki od receptorów dla EGF, FGF, PDGF, sygnałowanie z udziałem heterotrimerycznych białek G i kaskady kinaz MAP, a także w regulację procesu angiogenezy oraz stanu zapalnego. Biorąc pod uwagę fakt, że regulacja procesu angiogenezy, jak również działanie immunomodulacyjne i aktywujące szereg procesów w endogennych komórkach uszkodzonych tkanek, są wskazywane jako główne mechanizmy aktywności pro-regeneracyjnej komórek MSCs po ich podaniu do uszkodzonych tkanek (91,100,101,107,108,111,112), powyższe obserwacje odnośnie składu białkowego MSC-EVs mocno wskazują, że wspomniane efekty naprawcze zależne od komórek MSCs mogą być w części mediowane przez MSC-EVs wydzielane przez te komórki.

Dotychczasowe badania, w tym naszej grupy, wskazują, że bioaktywna zawartość przenoszona przez EVs jest również uzależniona od warunków hodowli komórek (145,249). Dla przykładu, EVs otrzymane z hodowli świńskich komórek MSCs z tkanki tłuszczowej – hodowanych w pożywce α -MEM suplementowanej 5% lizatem płytkowym, która następnie była zmieniona na pożywkę α -MEM bez dodatku żadnych suplementów oraz czynników wzrostu na okres 48h w celu zebrania pożywek do izolacji MSC-EVs, wykazują wzbogacenie w białka zaangażowane m.in. w angiogenezę, remodelowanie macierzy zewnątrzkomórkowej oraz regulację stanu zapalnego (250). Wykazano także, że komórki MSCs inkubowane w pożywce bezsurowiczej w warunkach hipoksji (0% FBS, 1% O₂ - warunki imitujące mikrośrodowisko niedotlenionych tkanek) wykazują wyższą ekspresję białek szlaków sygnałowania od FGF, PDGF oraz receptora EGF, które należą do kanonicznych szlaków angiogenezy (190). Co więcej, egzosomy wydzielane przez te komórki również wykazują wzbogacenie w białka szlaków sygnałowania od FGF, PDGF

oraz receptora EGF. Nanocząstki te wykazują ekspresję także innych białek zaangażowanych w m.in. sygnałowanie za pośrednictwem receptorów integrynowych, od TGF- β , szlaku Wnt czy też regulację stanu zapalnego (190). Na podstawie uzyskanych w niniejszej pracy wyników zinterpretowanych na tle doniesień pochodzących z analizy ludzkich komórek MSCs i ich EVs (190), można powiedzieć, że biaktywna zawartość białkowa przenoszona przez mysie MSC-EVs jest zasadniczo porównywalna do zawartości białkowej egzosomów wydzielanych przez ludzkie komórki MSCs. EVs mogą przenosić określony ładunek biologiczny, który w warunkach fizjologicznych jest przez nie wykorzystywany do komunikacji międzykomórkowej oraz stymulacji komórek akceptorowych (250).

Białka zaangażowane w adhezję komórek występujące w MSC-EVs analizowano także od kątem ich wzajemnych interakcji przy użyciu aplikacji STRING. Wykazano, że w centrum interaktomu znajdowała się m.in. β 1 integryna (Itgb1), α 4 integryna (Itga4), α 5 integryna (Itga5), α L integryna (Itgal), fibronektyna (Fn1) oraz antygen CD44. Co ciekawe, β 1 integryna jest białkiem, które uczestniczy w wiązaniu komórek HSCs do białek zrębu niszy hematopoetycznych KM w szpiku kostnym (219), natomiast antygen CD44 umożliwia wiązanie się tych komórek do kwasu hialuronowego na powierzchni komórek śródbłónka naczyń (218). Ligandem dla cząsteczki CD44 może być także osteopontyna oraz kolagen (258). Występowanie aż 106 białek adhezyjnych na powierzchni MSC-EVs, które udało mi się zidentyfikować, może wpływać na ich oddziaływanie z komórkami akceptorowymi w miejscu uszkodzenia lub ze śródbłónkiem naczyniowym po podaniu dożylnym pęcherzyków.

W kolejnym etapie zbadano oddziaływanie pomiędzy białkami zaangażowanymi w adhezję komórek, rozwój naczyń krwionośnych oraz gojenie się ran. W centrum utworzonego interaktomu wizualnie wyróżniały się dwie grupy białek: pierwsza związana z adhezją komórek obejmująca białka takie jak m.in.: β 1 integrynę (Itgb1), α 4 integrynę (Itga4), fibronektynę (Fn1), a druga związana z adhezją komórek oraz przekazywaniem sygnałów, obejmująca m.in.: kinazę białkową 14 aktywowaną mitogenem (Mapk14), kinazę białkową 1 aktywowaną mitogenem (Mapk1), winkulinę (Vcl), białkową kinazę tyrozynową 2 β (Ptk2b), antygen CD44 oraz aneksynę A5 (Anxa5). Wyniki licznych badań światowych wskazują na powszechne zaangażowanie szlaków sygnałowania, w których zaangażowane są kinazy białkowe aktywowane mitogenem (ang. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) w odpowiedź komórek na działanie np. czynników wzrostowych (261). Wykazano m.in., że kinazy MAP uczestniczą w przekaznictwie sygnału od receptora dla VEGF, czego wynikiem jest aktywacja proliferacji komórek oraz ekspresji określonych genów związanych z angiogenezą, co w rezultacie powoduje rozpoczęcie procesów tworzenia nowych naczyń krwionośnych (262). Z kolei aktywacja receptorowych kinaz tyrozynowych powoduje utworzenie wewnątrzkomórkowego kompleksu sygnalizacyjnego, wskutek czego sygnał biegnie kilkoma szlakami do wielu miejsc przeznaczenia w komórce, a kompleks sygnalizacyjny aktywuje i koordynuje liczne zmiany biochemiczne niezbędne do włączenia tak złożonych odpowiedzi jak proliferacja komórki (137). Co więcej, wykazano, że białkowa kinaza tyrozynowa 2 β odgrywa istotną rolę w chemotaksji i migracji komórek (263). Uzyskane w niniejszej pracy wyniki badań

odnośnie składu białkowego MSC-EVs, mogą zatem wskazywać na ich potencjalny udział w aktywacji szeregu szlaków sygnałowych w komórkach docelowych, nie tylko związanych bezpośrednio z aktywacją procesów angiogenezy, ale również proliferacji komórek oraz migracji, która stanowi również istotną funkcję komórek w procesach regeneracji tkanek, w tym komórek śródbłónki w czasie tworzenia nowych naczyń (264).

W kolejnym etapie pracy przeprowadzono analizę składu cząsteczek miRNA przenoszonych przez MSC-EVs w porównaniu do komórek rodzicielskich. W wyniku przeprowadzonej analizy udało się zidentyfikować 162 wspólne cząsteczki miRNA występujące zarówno w komórkach rodzicielskich (MSCs), jak również MSC-EVs. Co istotne, zidentyfikowano również 10 cząsteczek miRNA unikatowych dla MSC-EVs (miRNA-1952, 376a-3p, 182-5p, 668-3p, 1188-5p, 409-5p, 339-3p, 325-3p, 369-3p, 466f-5p) oraz 11 cząsteczek miRNA unikatowych dla komórek MSCs (miRNA-369-5p, 758-3p, 92b-3p, 671-3p, 466k, 293-3p, 327, 298-5p, 1967, 103-2-5p, 125b-2-3p). Taki profil może wynikać z selektywnego pakowania wybranych miRNA do pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, co obserwowano już we wcześniejszych badaniach innych grup (126,249).

Cząsteczki miRNA mogą indukować degradację transkryptów mRNA, z którym hybrydują lub bezpośrednio hamować jego translację (265). Biorąc pod uwagę fakt, że wiązanie pomiędzy miRNA, a docelowym mRNA nie musi być w pełni komplementarne, jedna cząsteczka miRNA może oddziaływać z transkryptami wielu genów regulując ich ekspresję (266). I tak przykładowo, w bazie sekwencji docelowych dla różnych miRNA (baza miRDB), dla miRNA-182-5p można znaleźć 538 przewidywanych docelowych transkryptów mRNA, dla miRNA-1188-5p – aż 180 przewidywanych docelowych mRNA, natomiast dla miRNA-339-3p - 22 sekwencje mRNA (<http://mirdb.org>). Z przeglądu literatury wynika natomiast, że wyciszenie miRNA-182-5p powoduje aktywację proliferacji komórek raka nerkowokomórkowego (220), miRNA-339-3p pełni rolę inhibitora inwazyjności komórek czerniaka (221), natomiast miRNA-1188 promuje różnicowanie neuronalne komórek MSCs oraz aktywację białka STAT1 (222). Ze względu na mnogość docelowych mRNA dla wymienionych miRNA, funkcje tych cząstek mogą być inne niż wymienione w innych typach komórek, a także zależeć od działania innych miRNA, które są obecne i aktywne w danym momencie w danej komórce. Zatem udział poszczególnych miRNA wykrytych w MSC-EVs w procesach regeneracji tkanek, wymaga dalszych pogłębionych badań.

Co istotne, wśród 162 cząsteczek miRNA wspólnych dla komórek MSCs oraz MSC-EVs, zaobserwowano nieznaczne wzbogacenie pęcherzyków w miRNA-126-3p, które znane jest jako miRNA o działaniu proangiogennym (223). Badania *Chen i wsp.* wykazały, że podanie komórek MSCs z nadekspresją miRNA-126 w miejsce uszkodzenia tkanek serca powoduje wzrost angiogenezy oraz poprawę parametrów hemodynamicznych pracy serca na drodze sygnałowania ERK/Akt (223). Wiadomo także, że miRNA-126 moduluje odpowiedź komórek śródbłónki na czynnik VEGF poprzez hamowanie inhibitorów szlaku VEGF, takich jak: SPRED1 (ang. *sprout-related EVH1 domain-containing protein 1*), czy też PIK3R2 (ang. *phosphoinositol-3 kinase regulatory subunit 2*), wskutek czego sygnał pochodzący od związanego czynnika wzrostu jest

przekazywany przez szlak MAPK/ERK oraz równolegle PI3K/AKT stymulując angiogenezę (267). Z kolei *Sicco i wsp.* wykazali, że EVs otrzymane z pożywek zebranych znad komórek MSCs inkubowanych w warunkach imitujących mikrośrodowisko stanu zapalnego (tj. hipoksja, brak substancji odżywczych) wykazują wzbogacenie w proangiogenne miRNA-126 oraz 199a (249). Do interesujących miRNA zidentyfikowanych w MSC-EVs należą także: miRNA-132, które przeciwdziała apoptozie i stresowi oksydacyjnemu w komórkach miokardium w sytuacji niewydolności serca (224) oraz miRNA-382, którego nadekspresja znacząco zwiększa proliferację komórek śródbłonna, ich migrację oraz tworzenie struktur kapilaropodobnych (225).

Uzyskane przeze mnie wyniki badań odnośnie profilu miRNA w MSC-EVs oraz ich odniesienie do danych literaturowych, sugerują udział cząsteczek miRNA przenoszonych przez te pęcherzyki w regulacji m.in. procesów angiogenezy, proliferacji oraz migracji w komórkach endogennych uszkodzonych tkanek, w tym tkanek serca, a także ich działanie cytoprotekcyjne, co ma również istotne znaczenie z punktu widzenia ograniczenia utraty funkcjonalnych komórek danej tkanki.

Wspomniana aktywność MSC-EVs w procesach naprawczych w tkankach, może zależeć także od przenoszonych transkryptów mRNA, co potwierdzają również badania uzyskane w tej pracy. Wykazałam bowiem także, że MSC-EVs mogą przenosić m.in. cząsteczki mRNA genów antyapoptotycznych (Bcl-2), jak również związanych z aktywacją procesów angiogenezy (VE-kadheryna, Gata-2) oraz kardiomiogenezy (Gata-4). Poziom transkryptów dla większości tych genów jest wprawdzie niższy w MSC-EVs w porównaniu z komórkami MSCs - z wyjątkiem mRNA dla Gata-4, czyli kluczowego czynnika transkrypcyjnego regulującego kardiomiogenezę (268) - jednakże wciąż może mieć znaczenie w regulacji tych procesów w komórkach docelowych, jeśli transfer tych transkryptów byłby wystarczająco efektywny.

Podsumowując, MSC-EVs mogą przenosić biaktywną zawartość pochodzącą z komórek rodzicielskich, na którą składają się m.in. białka, mRNA oraz miRNA, co zbadano w tej pracy. Rosnąca liczba badań wskazuje również, że EVs mogą przenosić także długie niekodujące RNA (lncRNA) o działaniu regulatorowym oraz bioaktywne lipidy (269,270), które nie były badane w tej pracy. Cząsteczki lncRNA, należące wraz z miRNA do grupy niekodujących RNA, mogą także pełnić rolę regulatorową, np. modulować aktywność oraz lokalizację kompleksów regulatorowych chromatyny (271). Tego typu badania zawartości lncRNA w MSC-EVs byłyby interesujące w celu pogłębionej analizy ich bioaktywnej zawartości, a także potencjalnego udziału w regeneracji. Co więcej, wykazano także, że egzosomy wykazują 2-3 krotne wzbogacenie w wybrane lipidy - w porównaniu do komórek rodzicielskich, w tym m.in. w cholesterol, sfingomielinę, glikosfingolipidy oraz fosfatydyloserynę (272). Skład lipidów w MSC-EVs, który nie był badany w tej pracy może mieć również potencjalne znaczenie dla ich aktywności biologicznej, co stanowi z pewnością ciekawy aspekt poznawczy i temat dla przyszłych badań.

Wpływ MSC-EVs na wybrane funkcje komórek docelowych *in vitro*

W kolejnym etapie badań objętych niniejszą pracą doktorską, zbadano internalizację MSC-EVs przez mysie komórki śródbłónka naczyń serca (MCEC) w warunkach kontrolnych oraz w warunkach imitujących mikrośrodowisko stanu zapalnego (tj. w obecności mediatorów stanu zapalnego oraz w hipoksji).

Wiadomo, że EVs mogą wnikać do komórek akceptorowych na drodze endocytozy niezależnej od klatryny oraz makropinocytozy (273). W wyniku przeprowadzonych w niniejszej pracy eksperymentów, zaobserwowano zwiększoną internalizację MSC-EVs do komórek docelowych w warunkach imitujących stan zapalny w odniesieniu do warunków kontrolnych, szczególnie krótko (po 4h) od momentu dodania MSC-EVs. Na powierzchni komórek śródbłónka naczyniowego aktywowanego cytokinami prozapalnymi (tj. IL-1 β , TNF- α), zaobserwowano wzrost ekspresji cząsteczek adhezyjnych VCAM-1 (CD106) oraz ICAM-1 (CD54) oraz selektyny P, które są zaangażowane typowo w adhezję subpopulacji leukocytów do endotelium (226). Jednakże wzrost gęstości antygenów na powierzchni komórek śródbłónka może zwiększać adhezję także innych komórek lub cząsteczek posiadających na swej powierzchni ligandy dla w/w cząsteczek adhezyjnych, w tym potencjalnie również MSC-EVs.

Ligandem dla ICAM-1 jest cząsteczka LFA-1 (heterodimer złożony z podjednostki integrynowej α L oraz β 2) (274), natomiast ligandem dla VCAM-1 jest cząsteczka VLA-4 (heterodimer złożony z podjednostki integrynowej α 4 oraz β 1) oraz LPAM-1 (heterodimer złożony z podjednostki integrynowej α 4 oraz β 7) (275). Na powierzchni MSC-EVs zidentyfikowałam w ramach niniejszej pracy, aż 106 białek uczestniczących w adhezji komórkowej, wśród których znajdowały się także m.in. integryny α L, β 2, α 4 oraz β 1, które mogą oddziaływać z cząsteczkami adhezyjnymi na aktywowanym śródbłónku naczyniowym, w tym z ICAM-1 i VCAM-1.

Z kolei ligandami dla P-selektyny (CD62P) oraz E-selektyny (CD62E) są antygeny CD162, CD24 oraz sialylowana cząsteczka Lewis X (276,277). Obok klasycznej funkcji wiązania frakcji dojrzałych komórek krwi do śródbłónka naczyniowego, E- i P-selektyny mogą być zaangażowane także m.in. w pierwszy etap wiązania się KM krwiotwórczych (HSCs) do komórek śródbłónka naczyniowego, co poprzedza etapy toczenia się tych komórek po powierzchni śródbłónka, a następnie ich przenikania do tkanek (278). Szczególnie istotną rolę w wiązaniu się komórek HSCs do powierzchni śródbłónka, a następnie ich migracji transendotelialnej do niszy osteogennej w szpiku, odgrywają integryny (278). Komórki MCEC - stymulowane w niniejszej pracy czynnikami prozapalnymi - wykazały zwiększoną ekspresję antygenów CD54, CD106 oraz CD62P w porównaniu do niestymulowanych komórek śródbłónka. Z kolei po 4h od momentu dodania MSC-EVs do tych komórek, obserwowano niższy poziom detekcji cząsteczek CD106, CD62E oraz CD62P, co może świadczyć o związaniu się MSC-EVs do powierzchni tych komórek poprzez swoiste oddziaływanie z tymi cząsteczkami, czego efektem było wysycenie części miejsc wiązania dla przeciwciał skierowanych przeciwko tym antygenom, co w efekcie obserwowano jako spadek ekspresji tych antygenów. Wynik ten koreluje z najwyższym poziomem internalizacji MSC-EVs przez te komórki,

obserwowanym również po 4h od momentu dodania MSC-EVs. Z kolei po dłuższym czasie koinkubacji komórek śródbłónka z MSC-EVs (po 24h od momentu dodania MSC-EVs), gęstość antygenów CD106, CD62E oraz CD62P zwiększyła się w porównaniu do wartości obserwowanych po 4h. Może to świadczyć o internalizacji MSC-EVs do komórek akceptorowych i powrocie ekspresji cząsteczek błonowych do poziomu zbliżonego do poziomu obserwowanego po stymulacji cytokinami prozapalnymi.

W doświadczeniach w niniejszej pracy zbadano także na powierzchni komórek MCEC, gęstość wybranych antygenów typowo występujących na mysich komórkach MSCs, w tym CD90 oraz Sca-1 (82–84). Antygeny te choć powszechnie występują na powierzchni komórek MSCs, mogą występować także na powierzchni komórek śródbłónka myszy (279,280). W przeprowadzonych badaniach, w przypadku antygeny CD90 zaobserwowano spadek gęstości tego antygeny na powierzchni komórek MCEC na skutek stymulacji prozapalnej, natomiast dodanie MSC-EVs spowodowało kolejny spadek jego gęstości na powierzchni tych komórek (po 4h). Z kolei w przypadku antygeny Sca-1, stymulacja prozapalna spowodowała istotny wzrost gęstości tego antygeny, natomiast po 4h od momentu dodania MSC-EVs obserwowano znaczny spadek gęstości tego antygeny, co może świadczyć o związaniu się pęcherzyków do powierzchni MCEC poprzez tę cząsteczkę i wysyceniu miejsc wiązania dla przeciwciała anti-Sca-1. Wyniki innych badań światowych wskazują, że antygen Sca-1 może wiązać się z kompleksem integrzyn $\alpha V\beta 3$ na innych komórkach i stymulować m.in. adhezję komórek satelitarnych mięśni (227). Ponieważ na powierzchni MSC-EVs występują integryny αV oraz $\beta 3$, takie oddziaływania mogą zatem zachodzić między komórkami śródbłónka, a MSC-EVs, co tłumaczy obserwowany w moich badaniach spadek dostępności antygeny Sca-1 po dodaniu pęcherzyków.

Zatem wzrost molekuł adhezyjnych na komórkach śródbłónka w stanie zapalnym może zwiększać oddziaływanie tych komórek z MSC-EVs oraz ich internalizację, co może mieć istotne znaczenie dla działania tych EVs szczególnie w miejscach uszkodzenia tkankowego, gdzie taki stan zapalny się toczy, czyli m.in. w uszkodzonym mięśniu sercowym oraz niedotlenionych tkankach kończyn.

Co ważniejsze, wzrost internalizacji MSC-EVs w warunkach imitujących mikrośrodowisko stanu zapalnego koreluje ze wzrostem żywotności komórek MCEC (mierzonej w 4h od momentu dodania MSC-EVs). Sama ekspozycja komórek śródbłónka na czynniki stanu zapalnego powodowała istotne obniżenie żywotności komórek MCEC w odniesieniu do warunków kontrolnych. Tymczasem dodanie do komórek pęcherzyków (MSC-EVs) powodowało istotny statystycznie wzrost żywotności komórek MCEC – do poziomu zbliżonego do komórek nieekspozowanych na czynniki prozapalne, co wyraźnie świadczy o aktywności cytoprotekcyjnej MSC-EVs względem komórek śródbłónka.

Jak wcześniej wspomniano, MSC-EVs mogą przenosić szereg czynników antyapoptotycznych, w tym miRNA-132 oraz miRNA-21-3p, które były już opisywane jako miRNA o znaczeniu cytoprotekcyjnym (224,281). Co więcej, MSC-EVs mogą także przenosić antyapoptotyczne transkrypty mRNA, w tym dla genu Bcl-2, który stanowi jeden z głównych czynników hamujących apoptozę (282). Wyniki badań opublikowanych przez

naszą grupę wskazują, że również EVs otrzymane z hodowli indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych mogą podnosić żywotność komórek śródbłónka w warunkach cytotoksycznych, co także jest zależne od zawartości molekularnej EVs, w tym szczególnie miRNA (114).

W niniejszej pracy wykazano także, że MSC-EVs mogą zawierać i przenosić także białka oraz miRNA o działaniu proangiogennym. Dlatego też, w celu potwierdzenia wpływu MSC-EVs na potencjał angiogeny komórek akceptorowych (MCEC), wykonałam test tworzenia kapilar na matryzeli, który stanowi jeden z głównych, szeroko stosowanych przez badaczy testów oceniających potencjał angiogeny komórek *in vitro* (208). Sama ekspozycja komórek MCEC na czynniki stanu zapalnego (tj. inkubacja z cytokinami prozapalnymi IL-1 β oraz TNF- α) nie wpłynęła na liczbę tworzonych struktur kapilarnych przez te komórki w porównaniu do komórek kontrolnych. Natomiast co istotne, dodanie MSC-EVs znacząco zwiększało potencjał komórek MCEC do tworzenia kapilar, w porównaniu do komórek kontrolnych. Z kolei, co ważne, dodanie MSC-EVs do komórek MCEC eksponowanych na cytokiny prozapalne, zwiększało potencjał angiogeny tych komórek - szczególnie w pierwszych godzinach trwania obserwacji, co może świadczyć o szybkim efekcie działania MSC-EVs związanym z transferem bioaktywnych cząsteczek do komórek śródbłónka. Otrzymane wyniki świadczą, że nanocząsteczki MSC-EVs mogą oddziaływać na kluczowe funkcje komórek akceptorowych, jakimi są komórki śródbłónka, poprzez dostarczenie białek, mRNA, miRNA, czynników transkrypcyjnych, co było również opisywane w literaturze (214). Jak wcześniej wspomniano, MSC-EVs mogą przenosić szereg białek, mRNA oraz miRNA zaangażowanych w regulację procesów angiogenezy, co może tłumaczyć efekt zwiększenia potencjału angiogeny komórek śródbłónka po inkubacji z MSC-EVs, obserwowany w badaniach *in vitro*.

Badanie zasiedlania niedotlenionych tkanek przez MSC-EVs w mysich modelach niedokrwiennego uszkodzenia tkanek *in vivo*

W kolejnym etapie badań objętych niniejszą pracą doktorską zbadano retencję MSC-EVs do różnych tkanek, podanych do żyły szyjnej w mysim modelu ostrego zawału mięśnia sercowego (ang. *acute myocardial infarction*, AMI). Zaobserwowałam, że niezależnie od czasu jaki upłynął od momentu reperfuzji do momentu dożylnego podania MSC-EVs (tj. 30 min. lub 48h), to krótko po podaniu pęcherzyków (4h) obserwowano ich akumulację przede wszystkim w wątrobie oraz w śledzionie, podczas gdy po 24h sygnał pochodzący od wybarwionych fluorescencyjnie MSC-EVs obserwowano wyłącznie w wątrobie. Świadczy to o tym, że MSC-EVs podane dożylnie ulegają bardzo szybkiemu usuwaniu z krwioobiegu i trafiają głównie do organów, gdzie w pierwszej kolejności napotykają naczynia włosowate, w tym do wątroby (283). Badania dotyczące retencji komórek macierzystych podawanych dożylnie także wskazują, że m.in. wątroba oraz śledziona stanowią te organy, które zatrzymują znaczną część przeszczepionych obiektów, co może zmniejszać efektywność regeneracji (284). W przypadku MSC-EVs, takie badania

w modelu AMI jak dotąd nie były prowadzone, natomiast wyniki przedstawione w niniejszej pracy stanowią jedno z pierwszych badań w tym zakresie.

Co istotne, nie obserwowano wyraźnego sygnału fluorescencji pochodzącego od przeszczepionych pęcherzyków w tkankach płuc, nerek, przewodu pokarmowego, szpiku kostnego, mięśni szkieletowych, a przede wszystkim w tkankach serca, gdzie doszło do uszkodzenia, co potwierdzono także w badaniach histologicznych z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej. Jedynie w tkankach serca - w badaniach obrazowych, zaobserwowano pojedyncze skupisko sygnału fluorescencji pochodzącego od MSC-EVs, świadczące o niskim, ale jednak mającym miejsce „zasiedlaniu” tego organu przez krążące pęcherzyki. Otrzymane wyniki świadczą, że MSC-EVs podane dożylnie nie podlegają znaczącej retencji w mięśniu sercowym, prawdopodobnie z powodu szybkiej hemodynamiki tego narządu. Jednak, wyniki badań światowych wskazują, że egzosomy uzyskane z hodowli komórek MSCs podane dożylnie mogą redukować obszar uszkodzenia pozawałowego mięśnia sercowego (196), co wyraźnie wskazuje jednak na konieczność „zasiedlania” tej tkanki przez krążące EVs lub na inne mechanizmy oddziaływania EVs z tkankami miokardium, które efektywnie mogą stymulować endogenne mechanizmy naprawcze. Pytanie, czy zachodzą one na drodze internalizacji EVs do tkanek miokardium, czy mają charakter działania głównie na komórki śródbłónka serca, pozostaje wciąż otwartym pytaniem. Brak sygnału fluorescencji pochodzącego z mięśnia sercowego wizualizowanego systemem In Vivo Optical Imaging System (przeznaczonego głównie do pomiaru luminescencji), może bowiem świadczyć o zbyt niskiej zdolności rozdzielczej tego urządzenia lub o rzeczywistym bardzo niskim „zasiedlaniu” tkanek serca przez krążące pęcherzyki. Nie można wykluczyć, że zwiększenie dawki podanych dożylnie MSC-EVs mogłoby wzmocnić sygnał i potwierdzić obecność MSC-EVs w sercu.

Badania innego zespołu wykazały, że biodystrybucja EVs w tkankach zależy m.in. od rodzaju komórek, z których pochodzą, drogi podania EVs oraz komórek docelowych, z którymi w szczególności oddziałują dzięki specyficznym molekułom, które przenoszą (283). Dla przykładu, EVs otrzymane z hodowli ludzkich komórek MSCs podane do żyły ogonowej zdrowych myszy wykazują retencję w wątrobie, śledzionie, przewodzie pokarmowym oraz płucach (283). W mojej ocenie – wynikającej z własnych badań i obserwacji, obecność sygnału fluorescencji w przewodzie pokarmowym nie jest wynikiem gromadzenia się EVs, ale wynika raczej z wysokiej autofluorescencji treści pokarmowej, ponieważ po jej wypłukaniu z każdego odcinka tego przewodu, fluorescencja przestaje być obserwowana, czego doświadczyłam we własnych badaniach.

W modelu zwierzęcym ostrego uszkodzenia nerek obserwowano retencję EVs nie tylko w wątrobie, śledzionie oraz płucach, czyli typowych organach wychytujących EVs, ale także w nerkach (285), co świadczy, że pęcherzyki mogą wykazywać jednak pewnego rodzaju „tropizm” do miejsca uszkodzenia. Z kolei w szczurzym modelu udaru mózgu, po podaniu dożylnym MSC-EVs, obserwowano ponownie ich akumulację w wątrobie, śledzionie oraz płucach, ale również słaby sygnał w mózgu (286), co potwierdza „zasiedlanie” miejsc uszkodzeń.

Biorąc pod uwagę, że niektóre grupy badawcze obserwowały obecność EVs w uszkodzonych nerkach i mózgu po ich dożylnym przeszczepieniu (285,286), w kolejnym etapie badań objętych niniejszą pracą doktorską, zbadano biodystrybucję MSC-EVs podanych do żyły ogonowej w mysim modelu niedokrwienego uszkodzenia kończyny (ang. *limb ischemia*, LI) – w wybranych narządach oraz niedotlenionych kończynach. W związku z tym, że we wcześniejszych badaniach *in vitro*, internalizację MSC-EVs obserwowałam szczególnie krótko po ich dodaniu (4h) do hodowli komórek MCEC, również w modelu *in vivo* narządy izolowałam od myszy po 4h od podania MSC-EVs do żyły ogonowej, a następnie po dobie od ich przeszczepienia. W badaniach wykazałam zwiększoną obecność MSC-EVs w nerkach, wątrobie oraz śledzionie myszy po 4h od momentu ich podania do żyły ogonowej, która była już jednak niższa po 24h od podania, co wskazuje na potencjalny szybki wpływ podanych MSC-EVs na komórki endogenne w uszkodzeniu i ich szybkie przemetabolizowanie w komórkach. Co ważniejsze, w badaniach obserwowano także retencję MSC-EVs w uszkodzonych kończynach po 4 oraz 24h od dożylnego podania. Jest to pierwsze doniesienie naukowe pokazujące znaczące „zasiedlanie” pęcherzyków MSC-EVs w niedotlenionych tkankach kończyn dolnych po uszkodzeniu niedokrwinnym.

Wcześniejsze badania *in vitro*, przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wykazały, że MSC-EVs przenoszą na swej powierzchni wiele białek związanych z adhezją komórkową, w tym cząsteczki uczestniczące w wiązaniu do powierzchni komórek śródbłónka naczyniowego. Można zatem postulować, że MSC-EVs są bardzo szybko przenoszone wraz z krwią, a następnie podlegają adhezji do aktywowanego śródbłónka naczyniowego, co może częściowo tłumaczyć fenomen „tropizmu” MSC-EVs do miejsca uszkodzenia tkankowego w kończynach.

Badania biodystrybucji EVs po podaniu dożylnym wykazały, że cząsteczki te podlegają szybkiej fazie transportu do wątroby, nerek, płuc oraz śledziony, a następnie dłuższej fazie ich usuwania z organizmu za pośrednictwem wątroby i nerek (287,288). U zwierząt zdrowych nie wykazano akumulacji EVs w mięśniach szkieletowych, szpiku kostnym, sercu, żołądku (289). W mysim modelu uszkodzenia nerek, obserwowano retencję EVs w nerkach, wątrobie, śledzionie oraz bardzo słaby sygnał w płucach (285).

Fenomen „tropizmu” pęcherzyków do uszkodzonych tkanek nie może być tłumaczony w mojej ocenie aktywną migracją tych obiektów w odpowiedzi na gradient sygnałów chemicznych wydzielanych w miejscu uszkodzenia – jak ma to miejsce w przypadku komórek – ponieważ EVs nie są obiektami żywymi, które w sposób aktywny mogłyby odpowiadać na sygnały chemiczne i podejmować aktywną migrację. Przypuszczam, że obserwowane zjawisko ma związek ze zmianami zachodzącymi na powierzchni aktywowanego śródbłónka – w miejscu, w którym toczy się stan zapalny – co zwiększa „lepkość” tego śródbłónka i wiązanie pęcherzyków w miejscu uszkodzenia. Obserwacje te stanowią istotne przesłanki dla dalszych optymalizacji preparatów leczniczych opartych o EVs, które można by podawać dożylnie – wciąż uzyskując efekt terapeutyczny w uszkodzonych tkankach.

Ocena potencjału regeneracyjnego MSC-EVs w modelach niedokrwiennego uszkodzenia tkanek *in vivo*

W następnym etapie, zbadano potencjał regeneracyjny MSC-EVs w mysim modelu AMI. W tym celu myszy poddano zabiegowi ischemiczno- reperfuzyjnego uszkodzenia mięśnia sercowego, a następnie po 2 dniach po zabiegu podawano MSC-EVs bezpośrednio do mięśnia sercowego, w okolicę okołozawałową. Wybrano podanie bezpośrednio do mięśnia sercowego ze względu na niską retencję po dożylnym podawaniu MSC-EVs w tym narzędzie, aby zwiększyć efektywność działania MSC-EVs. Tego typu domięśniowe, epikardialne podania, stanowią jedną z głównych dróg podania komórek w modelach zwierzęcych, jakie opracowano w celu podawania preparatów komórkowych w leczeniu uszkodzeń miokardium, celem zwiększenia ich skuteczności (108).

W wybranych punktach czasowych, w badaniach ujętych w niniejszej pracy, wykonywano echokardiografię u każdego zwierzęcia w celu oceny parametrów funkcjonalnych oraz strukturalnych serca. Zaobserwowano, że już w 9 dniu od zabiegu (czyli 7 dni po podaniu preparatów komórkowych lub MSC-EVs), w grupie zwierząt, którym podano MSC-EVs, zaobserwowano istotną poprawę parametru LVEF - frakcji wyrzutowej lewej komory (LK) serca oraz innych parametrów świadczących o poprawie funkcji i anatomii mięśnia sercowego – w porównaniu do grupy kontrolnej zwierząt, której podawano jedynie roztwór soli PBS. W przypadku zwierząt, którym podano komórki MSCs, również obserwowano poprawę parametrów funkcji serca w porównaniu z grupą kontrolną, jednak poprawa ta nie była tak znamienna jak to obserwowano w grupie myszy, którym podawano MSC-EVs. Zaobserwowane efekty po podaniu komórek MSCs, a w szczególności MSC-EVs, utrzymywały się aż do zakończenia eksperymentu, czyli do 32 dnia po zabiegu AMI.

W przypadku analizy parametrów anatomicznych serca, u myszy którym podano MSC-EVs obserwowano także istotną poprawę parametrów świadczących o spowolnieniu procesów niekorzystnej przebudowy (remodelingu) uszkodzonych tkanek serca, w tym istotne zwiększenie grubości ściany LK serca objętej zawałem podczas rozkurczu, w porównaniu do grupy kontrolnej zwierząt. Zaobserwowane zmiany histologiczne mogą świadczyć o zmniejszeniu utraty miokardium, jak również zahamowaniu przerostu pewnych obszarów mięśnia sercowego obserwowanych w grupach zwierząt, którym podawano MSC-EVs oraz komórki MSCs. Otrzymane wyniki potwierdzają zatem także korzystny wpływ podania całych komórek MSCs na parametry funkcjonalne i strukturalne LK serca, co było już wcześniej wielokrotnie opisywane także przez innych badaczy (100,101,107,108,111,112).

Jednakże, w związku z tym, że badane parametry funkcji i struktury serca, nie wykazały znacznej poprawy w przypadku podawania całych komórek MSCs, a wręcz przeciwnie ulegały zwiększonej poprawie w przypadku podania MSC-EVs, może to świadczyć, że efekt regeneracyjny obserwowany po podaniu komórek MSCs zależy głównie od ich aktywności parakrynej, w tym wydzielania MSC-EVs w miejscu przeszczepienia, a nie zależy istotnie od bezpośredniego różnicowania tych komórek w komórki miokardium, co powinno przełożyć się na znamienne wyższą poprawę funkcji

serca. Te obserwacje stoją w zgodzie z dotychczasowymi badaniami wskazującymi, że poprawa funkcji serca po podaniu komórek MSCs, zależy głównie od ich aktywności wydzielniczej - o działaniu m.in. cytoprotekcyjnym, immunomodulacyjnym oraz aktywującym endogenne mechanizmy naprawcze (102,196,290). Badania uzyskane w niniejszej pracy wskazują, że być może w przyszłości podania całych komórek MSCs będzie można zastąpić przeszczepami preparatów MSC-EVs o porównywalnej (lub większej) efektywności biologicznej i naprawczej. Również nieliczne badania innych zespołów potwierdzają skuteczność terapeutyczną MSC-EVs w leczeniu uszkodzeń mięśnia sercowego w modelach zwierzęcych (194,196).

W związku z zaobserwowaną retencją MSC-EVs w uszkodzonych tkankach kończyny, zbadano także potencjał regeneracyjny tych nanocząstek podawanych kilkukrotnie dożylnie (co 3 dni począwszy od dnia wystąpienia niedotlenienia tkanek) w modelu niedokrwienego uszkodzenia kończyny (LI). Przeprowadzone badania wykazały istotnie zwiększoną perfuzję krwi w tkankach uszkodzonej kończyny już w 7 dniu od uszkodzenia w grupie zwierząt, którym podawano MSC-EVs w odniesieniu do grupy kontrolnej, której podawano jedynie neutralny nośnik (sól PBS). Podwyższona perfuzja krwi w uszkodzonej kończynie utrzymywała się w każdym badanym punkcie czasowym aż do 21 dnia od uszkodzenia, kiedy zakończono eksperyment. W przypadku grupy kontrolnej myszy, również obserwowano wzrost perfuzji krwi w badanych punktach czasowych, co świadczy o postępującej samoregeneracji uszkodzonych tkanek.

Z wcześniej wykonanych badań w ramach realizacji innego projektu badawczego, wynika, że uszkodzeniu niedokrwienemu kończyny towarzyszy stan zapalny. Samoustępujące zapalenie jest pierwszym etapem naprawy uszkodzenia/ rany, po którym następuje tworzenie się tkanki ziarninowej i jej ewentualna przebudowa (291,292), w tym tworzenie się nowych naczyń krwionośnych. Różne czynniki uwalniane przez uszkodzony lub aktywowany śródbłonek naczyń, w tym reaktywne formy tlenu, mogą stymulować makrofagi, limfocyty oraz fibroblasty do wydzielania cytokin prozapalnych, które mogą mieć działanie niekorzystne dla tkanek, ale mogą także aktywować endogenne komórki macierzyste rezydujące w określonych tkankach i promować efekty regeneracyjne (291).

Wzrost perfuzji tkanek kończyny po uszkodzeniu ischemicznym - obserwowany w grupie zwierząt, którym podawano MSC-EVs, był skorelowany ze wzrostem gęstości kapilar w tkankach mięśniowych pobranych *post-mortem* po zakończeniu eksperymentu (21 dzień). Wzrost liczby kapilar świadczy o powstaniu krążenia obocznego, które zastępuje funkcje zablokowanego i przeciętego głównego naczynia krwionośnego (tętnicy udowej) oraz zaopatruje tkanki kończyny w tlen oraz substancje odżywcze, co obserwuje się w takim uszkodzeniu (8,293). Efektywność powstawania takiego krążenia obocznego jest związana z aktywnością proangiogenną preparatów podawanych do uszkodzonych tkanek (259). Z kolei wzrost liczby kapilar obserwowany po podaniu preparatów MSC-EVs, był skorelowany ze wzrostem poziomu tlenku azotu (NO) w tkankach mięśniowych zwierząt, którym podawano MSC-EVs i był wyraźnie wyższy, w porównaniu do grupy kontrolnej zwierząt. NO ogrywa istotną rolę w modulacji angiogenezy, która polega na stymulacji proliferacji oraz różnicowania komórek śródbłonna, dzięki aktywacji syntazy NO (eNOS) (294).

W tkankach mięśni szkieletowych obu grup zwierząt – którym podawano roztwór soli PBS (kontrola) lub MSC-EVs - w końcowym punkcie eksperymentu, w którym pobierano tkanki do dalszych analiz biochemicznych, nie obserwowano zwiększonego poziomu O_2^- , co świadczy o tym, że MSC-EVs nie wywołują wtórnego stanu zapalnego po przeszczepieniu. Doniesienia literaturowe wskazują, że EVs wydzielane przez komórki MSCs wykazują właściwości przeciwzapalne poprzez m.in. hamowanie szlaku sygnałowania, w który zaangażowane są białko STAT3, blokowanie funkcji limfocytów T, jak również modyfikację wydzielania cytokin przez komórki dendrytyczne, limfocyty T i komórki NK (295,296). Efekt antyzapalny wywierany przez podane MSC-EVs był także obserwowany przez inne grupy badawcze (249).

Badania proteomiczne przeprowadzone w niniejszej pracy wykazały, że MSC-EVs mogą przenosić białka o działaniu proangiogennym. W związku z tym, wykonano analizę Western blot zabezpieczonych tkanek mięśni w celu detekcji aktywacji wybranych szlaków związanych z angiogenezą – szlaków, w które zaangażowane są białka eNOS oraz Akt. Zaobserwowano wzrost ekspresji ufosforylowanej formy eNOS w stosunku do całkowitej puli tego białka, co świadczy o aktywacji tego szlaku w grupie zwierząt której podawano MSC-EVs w odniesieniu do grupy kontrolnej. Natomiast poziom ufosforylowanej formy Akt w tej grupie utrzymywał się na niezmiennym poziomie. Wzrost ekspresji ufosforylowanej formy białka eNOS był skorelowany ze spadkiem ekspresji kaweoliny-1 w tkankach pobranych z niedotlenionych kończyn myszy, którym podawano MSC-EVs w odniesieniu do myszy grupy kontrolnej (którym podawano roztwór soli PBS). Kaweolina-1 jest białkiem, które powoduje inaktywację cząsteczki eNOS, w rezultacie czego maleje produkcja NO (230). Nie obserwowano natomiast wzrostu poziomu silnie proangiennego czynnika wzrostowego VEGF po podawaniu MSC-EVs. Ze względu na fakt, że analizę wykonano w tkankach pobranych od myszy w 21 dniu od zabiegu, nie można wykluczyć, że wzrost tego białka mógł wystąpić we wcześniejszych punktach doświadczalnych. Co ciekawe, wykazano nieznaczny wzrost ekspresji białka Lyve-1, które uczestniczy w procesach limfangiogenezy. Choć pojawiło się doniesienie naukowe mówiące o udziale limfangiogenezy w procesie regeneracji skóry (231), wciąż niewiele wiadomo o jej udziale w regeneracji niedotlenionych tkanek. W literaturze głównie opisuje się udział limfangiogenezy w procesach nowotworowych (297). Zaobserwowany wzrost ekspresji białka Lyve-1, może świadczyć, że MSC-EVs być może odpowiadają za regenerację uszkodzonych tkanek na drodze stymulacji procesów angiogenezy i limfangiogenezy. Niniejsza praca doktorska zawiera jedno z pierwszych doniesień mówiących o potencjalnym udziale tego zjawiska w procesie regeneracji niedotlenionych tkanek w modelu niedokrwiennego uszkodzenia kończyny LI i jest częścią wspólnej publikacji przygotowywanej obecnie wraz z zespołem Prof. Ramarosona Andriantsitohaina z INSERM U1063, Stress Oxydant et Pathologies Métaboliques, Institut de Biologie en Santé, Angers z Francji, we współpracy z którym ta część badań została wykonana w czasie mojego stażu w tym instytucie.

W mojej pracy wykazałam, że MSC-EVs mogą przenosić wiele białek zaangażowanych w proliferację komórek, odpowiedź na uszkodzenie tkankowe, gojenie się ran i uszkodzeń, jak również rozwój struktur anatomicznych, co świadczy o ich

potencjalnym udziale w regulacji procesów różnicowania się komórek w tkankach. Co więcej, wykazałam, że mogą one przenosić także szereg cząsteczek miRNA, będących regulatorami ekspresji wielu ważnych genów. Wykonane w ramach niniejszej pracy doktorskiej badanie przedkliniczne biodystrybucji MSC-EVs jest pierwszym doniesieniem wskazującym na niewielką retencję MSC-EVs w mięśniu sercowym po podaniu dożylnym, a także pierwszym doniesieniem pokazującym taką retencję MSC-EVs w uszkodzonych mięśniach kończyny.

Co istotne, potencjał regeneracyjny frakcji MSC-EVs – stanowiącej mieszaninę ektosomów i egzosomów otrzymanych z komórek MSCs szpiku kostnego, zbadany w modelach ostrego zawału mięśnia sercowego oraz niedokrwiennego uszkodzenia kończyny, został w niniejszej pracy skorelowany z szczegółową charakterystyką molekularną i funkcjonalną MSC-EVs, co stanowi w mojej ocenie główny walor przeprowadzonych badań – wskazując na potencjalne mechanizmy działania MSC-EVs w uszkodzonych tkankach. Wyniki badań światowych pokazują, że komórki MSCs, jak również pochodzące z nich EVs mają podobny mechanizm promowania regeneracji uszkodzonych tkanek poprzez parakrynnie działanie na endogenne komórki (298), jednak terapia przy udziale MSC-EVs wydaje się być bezpieczniejsza niż w przypadku podawania całych komórek, co z pewnością wymaga dalszych optymalizacji.

Warto zauważyć na zakończenie, że choć EVs nie mają jeszcze swojego miejsca w klasyfikacji biologicznych produktów leczniczych terapii zaawansowanych, jak ma to miejsce w przypadku komórek macierzystych, doniesienia literaturowe pokazują, że podejmowane są działania mające na celu klasyfikację tych nanocząsteczek jako biologicznych produktów leczniczych (299). Co więcej, pierwsze grupy badawcze podejmują działania mające na celu optymalizację procedur wytwarzania tych preparatów zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Wytwarzania (ang. *Good Manufacturing Practice*), a tym samym także doprecyzowania kryteriów zwolnienia wytworzonych preparatów do podania do pacjentów (300). Z pewnością niedaleka przyszłość przyniesie nie tylko nowe informacje odnośnie natury biologicznej i potencjału EVs pochodzących z KM, w tym MSCs, ale również nowe podejścia do ich wytwarzania w standardzie umożliwiającym przyszłe, praktyczne zastosowania terapeutyczne u pacjentów.

6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE

Najważniejsze osiągnięcia i wyniki uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej obejmują:

1. Charakterystykę wieloantygenową oraz potwierdzenie potencjału multipotencjalnego mysich komórek MSCs;
2. Izolację MSC-EVs oraz charakterystykę ich morfologii, rozkładu wielkości oraz składu molekularnego, potwierdzającego obecność bioaktywnej zawartości komórek rodzicielskich MSCs, w tym białek zaangażowanych w komunikację międzykomórkową oraz procesy regeneracji uszkodzonych tkanek, a także transkryptów miRNA oraz mRNA wykazujących działanie proangiogenne oraz cytoprotekcyjne;
3. Ocenę funkcjonalną wpływu MSC-EVs na komórki śródbłónka mięśnia sercowego, w warunkach kontrolnych, jak również imitujących mikrośrodowisko stanu zapalnego, potwierdzającą m.in. potencjał proangiogeny i cytoprotekcyjny badanych preparatów MSC-EVs *in vitro*, co może mieć istotne znaczenie dla ich potencjału regeneracyjnego *in vivo*;
4. Analizę retencji MSC-EVs podanych dożylnie w mysim modelu zawału serca *in vivo*, potwierdzającą niewielką obecność MSC-EVs w tkankach uszkodzonego serca przy takiej drodze podania;
5. Analizę retencji MSC-EVs podanych dożylnie w modelu niedokrwienego uszkodzenia kończyny *in vivo*, potwierdzającą tropizm MSC-EVs do uszkodzonych tkanek kończyny;
6. Porównanie potencjału regeneracyjnego komórek MSCs oraz preparatów MSC-EVs podanych domięśniowo w mysim modelu zawału serca *in vivo*, gdzie wykazano poprawę czynności mięśnia sercowego oraz zahamowanie niekorzystnej przebudowy tkanek serca po podaniu MSC-EVs;
7. Ocenę potencjału regeneracyjnego MSC-ECs podawanych dożylnie w mysim modelu niedokrwienego uszkodzenia kończyny *in vivo*, gdzie wykazano wzrost perfuzji niedotlenionych tkanek oraz towarzyszący temu wzrost gęstości kapilar w tych tkankach, skorelowany z aktywacją szlaków proangiogennych.

Najważniejsze wnioski płynące z przedstawionych badań:

1. Komórki MSCs mogą stanowić źródło pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przenoszących bioaktywną zawartość komórek rodzicielskich, które mogą modulować funkcje komórek docelowych, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*, co można wykorzystać w regeneracji tkanek.
2. MSC-EVs ze względu na promowane efekty regeneracyjne, mogą częściowo zastąpić preparaty komórkowe – oparte o komórki MSCs, wykorzystywane w regeneracji wybranych uszkodzeń tkankowych.
3. Wykorzystanie bioaktywnych preparatów MSC-EVs w regeneracji uszkodzonych tkanek może stanowić nowy kierunek rozwoju medycyny regeneracyjnej wykorzystującej biologiczne produkty lecznicze terapii zaawansowanej.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Wożakowska-Kapłon B. Choroba niedokrwiennej serca- aspekty kliniczne i społeczne. Stud Med Akad Świętokrzyskiej. 2003;tom 1:123–33.
2. Novo S, Coppola G, Milio G. Critical Limb Ischemia: Definition and Natural History. Curr Drug Target -Cardiovascular Hematol Disord. 2004;4(3):219–25.
3. Piskorz J, Wójcik G, Iłzecka J, Kozak-Putowska D. Wczesna rehabilitacja pacjentów po udarze niedokrwinnym mózgu. Med Ogólna i Nauk o Zdrowiu. 2014;20(4):351–5.
4. Allen DG, Orchard CH. Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. Circ Res. 1987;60(2):153–68.
5. Pike MM, Luo CS, Clark MD, Kirk KA, Kitakaze M, Madden MC, et al. NMR measurements of Na⁺ and cellular energy in ischemic rat heart: role of Na⁽⁺⁾-H⁺ exchange. Am J Physiol. 1993;265(6 Pt 2):H2017-26.
6. Toyoda Y, Shida T, Wakita N, Ozaki N, Takahashi R, Okada M. Evidence of apoptosis induced by myocardial ischemia: A case of ventricular septal rupture following acute myocardial infarction. Cardiology. 1998;90(2):149–51.
7. Hofstra L, Liem IH, Dumont EA, Boersma HH, Van Heerde WL, Doevendans PA, et al. Visualisation of cell death in vivo in patients with acute myocardial infarction. Lancet. 2000;356(9225):209–12.
8. Matsui Y, Morimoto J, Uede T. Role of extracellular matrix proteins in cardiac tissue remodeling after myocardial infarction. World J Biol Chem. 2010;1(5):69–80.
9. Cleutjens JPM, Blankesteijn WM, Daemen MJAP, Smits JFM. The infarcted myocardium: Simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions. Cardiovasc Res. 1999;44(2):232–41.
10. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: A consensus paper from an International Forum on Cardiac Remodeling. J Am Coll Cardiol. 2000;35(3):569–82.
11. Van Den Borne SWM, Diez J, Blankesteijn WM, Verjans J, Hofstra L, Narula J. Myocardial remodeling after infarction: The role of myofibroblasts. Nat Rev Cardiol. 2010; 7(1):30-7.
12. Barallobre-Barreiro J, Didangelos A, Schoendube FA, Drozdov I, Yin X, Fernández-Caggiano M, et al. Proteomics analysis of cardiac extracellular matrix remodeling in a porcine model of ischemia/reperfusion injury. Circulation. 2012;125(6):789–802.
13. Cleutjens JP, Verluyten MJ, Smiths JF, Daemen MJ. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. Am J Pathol. 1995; 147(2):325-338.
14. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart disease and stroke statistics-2016 update a report from the American Heart Association. Circulation. 2016; 133(4):38-48.
15. Cierniak-Piotrowska M, Marciniak G, Stańczak J. Statystyka zgonów i umieralności z powodu chorób układu krążenia. In: Strzelecki Z, Szymborski J, editors. Zachorowalność i umieralność na choroby układu krążenia a sytuacja demograficzna Polski. Główny Urząd Statystyczny; 2015. p. 1–28.
16. Patel MR, Calhoon JH, Dehmer GJ, Grantham JA, Maddox TM, Maron DJ, et al. ACC/AATS/AHA/ASE/ASNC/SCAI/SCCT/STS 2017 Appropriate Use Criteria for Coronary Revascularization in Patients With Stable Ischemic Heart Disease: A Report of the American College of Cardiology Appropriate Use Criteria Task Force, American Association for T. J Am Coll Cardiol. 2017;69(17):2212–41.
17. Steg PG, James SK, Atar D, Badano LP, Blomström-Lundqvist C, Borger MA, et al. Wskazania ESC dotyczące postępowania w ostrym zawał serca z przetrwałym uniesieniem odcinka ST. Kardiol Pol. 2012;70(supl. VI):255–318.

18. Nordmann AJ, Hengstler P, Harr T, Young J, Bucher HC. Clinical outcomes of primary stenting versus balloon angioplasty in patients with myocardial infarction: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Med.* 2004;116(4):253–62.
19. Gapska P, Kurpisz M. Perspective in optimization of stem cell therapies for heart regeneration. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej.* 71(0):975–87.
20. Gapska P, Kurpisz M. Badania przedkliniczne i próby kliniczne z zastosowaniem czynników pro-angiogennych w chorobach naczyniowo-sercowych – genetycznie modyfikowane mioblasty. *Postępy Pol Med i Farm.* 2011;1(1):67–74.
21. Drozd T, Debicka-Dabrowska D, Styczkiewicz K, Czarnecka D, Kawecka-Jaszcz K. [New non-pharmacological treatment methods in heart failure]. *Przegl Lek.* 2014;71(8):441–6.
22. Hartley A, Marshall DC, Saliccioli JD, Sikkell MB, Maruthappu M, Shalhoub J. Trends in mortality from ischemic heart disease and cerebrovascular disease in Europe: 1980 to 2009. Vol. 133, *Circulation.* 2016;133(20):1916–26.
23. Yu H, Lu K, Zhu J, Wang J. Stem cell therapy for ischemic heart diseases. Vol. 121, *British Medical Bulletin.* 2017;121(1):135–54.
24. Fowkes FGR, Rudan D, Rudan I, Aboyans V, Denenberg JO, McDermott MM, et al. Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: A systematic review and analysis. Vol. 382, *The Lancet.* 2013;382(9901):1329–40.
25. Socha P, Dyś K, Witkiewicz W, Masłowski L. Wewnątrznaczyniowe leczenie ostrego niedokrwienia kończyn dolnych. 2013;214–8.
26. Callum K, Bradbury A. ABC of arterial and venous disease: Acute limb ischaemia. *BMJ.* 2000;320(7237):764–7.
27. Bulińska K, Kropielnicka K, Jasiński T, Dąbrowska G, Jasiński R, Katarzyna S-T, et al. Kompleksowa rehabilitacja pacjentów z chromaniem przestankowym w przewlekłym niedokrwieniu kończyn dolnych. *Fizjoterapia.* 2012;20(4):3–16.
28. Budge J, Patterson B, Loftus I. Acute and chronic limb ischaemia. *Surg (United Kingdom).* 2016;34(4):183–7.
29. Kwiatkowski A, Nosek R. Choroby układu naczyniowego. In: *Chirurgia Ogólna dla Stomatologów.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL. 2006.
30. Krishna SM, Moxon J V., Golledge J. A review of the pathophysiology and potential biomarkers for peripheral artery disease. *Int J Mol Sci.* 2015;16(5):11294–322.
31. Chudek J, Ziaja D. Cilostazol w leczeniu niedokrwienia kończyn dolnych Cilostazol in the therapy of lower limb ischemia. *Chir Pol.* 2014;6–11.
32. Goldstein JA, Mishkel G. Choosing the correct therapeutic option for acute limb ischemia. Vol. 3, *Interventional Cardiology.* 2011;3:381–9.
33. Szymańska J, Nawotny J, Nowakowska I, Brząk A, Nawotny-Czupryna O. Wpływ terapii energotonowej na zasięg chodu pacjentów z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych. 2011;1(1):279–92.
34. Trounson A, McDonald C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. Vol. 17, *Cell Stem Cell.* 2015;17(1):11–22.
35. Zuba-Surma EK, Guo Y, Taher H, Sanganalmath SK, Hunt G, Vincent RJ, et al. Transplantation of expanded bone marrow-derived very small embryonic-like stem cells (VSEL-SCs) improves left ventricular function and remodelling after myocardial infarction. *J Cell Mol Med.* 2011;15(6):1319–28.
36. Gao LR, Chen Y, Zhang NK, Yang XL, Liu HL, Wang ZG, et al. Intracoronary infusion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction: Double-blind,

- randomized controlled trial. *BMC Med.* 2015;13(162):1–15.
37. Zhang J, Wu Y, Chen A, Zhao Q. Mesenchymal stem cells promote cardiac muscle repair via enhanced neovascularization. *Cell Physiol Biochem.* 2015;35(3):1219–29.
 38. Yan B, Abdelli LS, Singla DK. Transplanted induced pluripotent stem cells improve cardiac function and induce neovascularization in the infarcted hearts of db/db mice. *Mol Pharm.* 2011;8(5):1602–10.
 39. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Escalation Study of Intravenous Adult Human Mesenchymal Stem Cells (Prochymal) After Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(24):2277–86.
 40. Houtgraaf JH, Den Dekker WK, Van Dalen BM, Springeling T, De Jong R, Van Geuns RJ, et al. First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2012;59(5):539–40.
 41. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of Fibroblast Colonies in Monolayer Cultures of Guinea Pig Bone Marrow and Spleen Cells. *Cell Prolif.* 1970;3(4):393–403.
 42. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova K V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1966;16(3):381–90.
 43. Elahi KC, Klein G, Avci-Adali M, Sievert KD, Macneil S, Aicher WK. Human mesenchymal stromal cells from different sources diverge in their expression of cell surface proteins and display distinct differentiation patterns. *Stem Cells Int.* 2016;5646384:1–9.
 44. Hayes M, Curley G, Ansari B, Laffey JG. Clinical review: Stem cell therapies for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome - hope or hype? *Crit Care.* 2012;16(205):1–14.
 45. Ratajczak MZ. Komórki macierzyste i ich potencjalne wykorzystanie w klinice. *Rocz Teol Katol.* 2012;XI/1:95–107.
 46. Sarugaser R, Hanoun L, Keating A, Stanford WL, Davies JE. Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy. *PLoS One.* 2009;4(8):e6498.
 47. Elahi KC, Klein G, Avci-Adali M, Sievert KD, Macneil S, Aicher WK. Human mesenchymal stromal cells from different sources diverge in their expression of cell surface proteins and display distinct differentiation patterns. *Stem Cells Int.* 2016;5646384:1–9.
 48. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells.* 2006;24(5):1294–301.
 49. Li C, Wu X, Tong J, Yang X, Zhao J, Zheng Q, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6(1):55.
 50. Kim K Il, Park S, Im G Il. Osteogenic differentiation and angiogenesis with cocultured adipose-derived stromal cells and bone marrow stromal cells. *Biomaterials.* 2014;35(17):4792–804.
 51. Shen X, Pan B, Zhou H, Liu L, Lv T, Zhu J, et al. Differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes is regulated by miRNA-1-2 via WNT signaling pathway. *J Biomed Sci.* 2017;24(29):1–8.
 52. Li H, Yu B, Zhang Y, Pan Z, Xu W, Li H. Jagged1 protein enhances the differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;341(2):320–5.
 53. Song K, Wang Z, Li W, Zhang C, Lim M, Liu T. In vitro culture, determination, and directed differentiation of adult adipose-derived stem cells towards cardiomyocyte-like cells induced by angiotensin II. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013;170(2):459–70.
 54. Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A, Wei ESK. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg.* 2003;75(3):775–9.

55. Nagata H, Ii M, Kohbayashi E, Hoshiga M, Hanafusa T, Asahi M. Cardiac Adipose-Derived Stem Cells Exhibit High Differentiation Potential to Cardiovascular Cells in C57BL/6 Mice. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(2):141–51.
56. Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, et al. Mesenchymal Stem Cells Can Be Differentiated Into Endothelial Cells In Vitro. *Stem Cells.* 2004;22(3):377–84.
57. Chen MY, Lie PC, Li ZL, Wei X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.* 2009;37(5):629–40.
58. Janeczke-Portalska K, Leferink A, Groen N, Fernandes H, Moroni L, van Blitterswijk C, et al. Endothelial Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells. *PLoS One.* 2012;7(10):e46842.
59. Islam A, Bielat KL, Glomski C, Henderson ES. In vitro growth and hemopoietic differentiation of mouse bone marrow-derived adherent stromal cells in long-term culture: formation of spheroidal bodies mimicking hemopoietic anlagen. *J Med.* 1989;20(3–4):193–207.
60. Kadner A, Hoerstrup SP, Zund G, Eid K, Maurus C, Melnitchouk S, et al. A new source for cardiovascular tissue engineering: Human bone marrow stromal cells. *Eur J Cardio-thoracic Surg.* 2002;21(6):1055–60.
61. Marlicz W, Zuba-Surma E, Kucia M, Blogowski W, Starzynska T, Ratajczak MZ. Various types of stem cells, including a population of very small embryonic-like stem cells, are mobilized into peripheral blood in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2012;18(9):1711–22.
62. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13(12):4279–95.
63. Sharpe PT. Dental mesenchymal stem cells. *Development.* 2016;143(13):2273–80.
64. Lu L, Liu Y, Yang S, Zhao Q, Wang X, Gong W, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica.* 2006;91(8):1017–26.
65. Barberini D, Freitas NP, Magnoni M, Maia L, Listoni A, Heckler M, et al. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5(1):25.
66. Jin H, Bae YK, Kim M, Kwon S-J, Jeon HB, Choi SJ, et al. Parametric studies of space infrared sensors. *Comp Anal Hum Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, Umbilical Cord Blood as Sources Cell Ther.* 2013;14:17989–8001.
67. Alvarez-Viejo M, Menendez-Menendez Y, Blanco-Gelaz MA, Ferrero-Gutierrez A, Fernandez-Rodriguez MA, Gala J, et al. Quantifying mesenchymal stem cells in the mononuclear cell fraction of bone marrow samples obtained for cell therapy. *Transplant Proc.* 2013;45(1):434–9.
68. Minonzio G, Corazza M, Mariotta L, Gola M, Zanzi M, Gandolfi E, et al. Frozen adipose-derived mesenchymal stem cells maintain high capability to grow and differentiate. *Cryobiology.* 2014;69(2):211–6.
69. Raposio E, Simonacci F, Perrotta RE. Adipose-derived stem cells: Comparison between two methods of isolation for clinical applications. *Ann Med Surg.* 2017;20:87–91.
70. Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, et al. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica.* 2006;91(8):1017–26.
71. Gao S, Zhao P, Lin C, Sun Y, Wang Y, Zhou Z, et al. Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells into Neuron-Like Cells Which Are Compatible with Photocurable Three-Dimensional Scaffolds. *Tissue Eng Part A.* 2014;20(7–8):1271–84.
72. Mu MW, Zhao ZY, Li CG. Comparative study of neural differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by different induction methods. *Genet Mol Res.* 2015;14(4):14169–76.

73. Parivar K, Baharara J, Sheikholeslami A. Neural differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells treated with sex steroid hormones and basic fibroblast growth factor. *Cell J*. 2015;17(1):27–36.
74. Hospital TE, Science V, Zhang W, Science V. Differentiation of isolated human umbilical cord mesenchymal stem cells into neural stem cells. *Int J Ophthalmol*. 2016;9(1):41–7.
75. Rafieemehr H, Kheirandish M, Soleimani M. Improving the neuronal differentiation efficiency of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells cultivated under appropriate conditions. *Iran J Basic Med Sci*. 2015;18(11):1100–6.
76. Ikegame Y, Yamashita K, Hayashi S-I, Mizuno H, Tawada M, You F, et al. Comparison of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow for ischemic stroke therapy. *Cytotherapy*. 2011;13(6):675–85.
77. Martin-Rendon E, Sweeney D, Lu F, Girdlestone J, Navarrete C, Watt SM. 5-Azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies. *Vox Sang*. 2008;95(2):137–48.
78. Abdanipour A, Tiraihi T, Delshad A. Trans-differentiation of the adipose tissue-derived stem cells into neuron-like cells expressing neurotrophins by selegiline. *Iran Biomed J*. 2011;15(4):113–21.
79. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;7(5):393–5.
80. Montanucci P, Basta G, Pescara T, Pennoni I, Giovanni F Di, Calafiore R. New Simple and Rapid Method for Purification of Mesenchymal Stem Cells from the Human Umbilical Cord Wharton Jelly. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(21–22):2651–61.
81. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(1):204.
82. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R, Gaupp D, Hughes C, Kopen GC, et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem*. 2003;89(6):1235–49.
83. Da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt11):2204–13.
84. Da Silva Meirelles L, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: Isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol*. 2003;123(4):702–11.
85. Henry C, Quevedo KE. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *PNAS*. 2009;106(33):14022–14027.
86. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: Engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg*. 2002;73(6):1919–26.
87. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999;103(5):697–705.
88. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*. 2002;105(1):93–8.
89. Choi YS, Disting GJ, Stubbs S, Arunothayaraj S, Han XL, Collas P, et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes. *J Cell Mol Med*. 2010;14(4):878–89.
90. Stem MM, Via C, Stat T. microRNA-124 Regulates Cardiomyocyte Differentiation of Bone. *Stem Cells*. 2012;1746–55.
91. Hong KU, Guo Y, Li QH, Cao P, Al-Maqtari T, Vajravelu BN, et al. c-kit⁺ cardiac stem cells alleviate post-myocardial infarction left ventricular dysfunction despite poor engraftment and

- negligible retention in the recipient heart. *PLoS One*. 2014;9(5):e96725.
92. Karantalis V, Hare JM. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circ Res*. 2015;116(8):1413–1430.
 93. Zhang Q, Shi S, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi S, et al. Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Gingiva Are Capable of Immunomodulatory Functions and Ameliorate Inflammation-Related Tissue Destruction in Experimental Colitis. *J Immunol*. 2009;183(12):7787–7798.
 94. van Buul GM, Villafuertes E, Bos PK, Waarsing JH, Kops N, Narcisi R, et al. Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture. *Osteoarthr Cartil*. 2012;20(10):1186–96.
 95. Kim HW, Song WJ, Li Q, Han SM, Jeon KO, Park SC, et al. Canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells ameliorate severe acute pancreatitis by regulating T cells in rats. *J Vet Sci*. 2016;17(4):539–548.
 96. Gneccchi M. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J*. 2006;20(6):661–9.
 97. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2007;109(1):228–34.
 98. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: Role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*. 2008;111(3):1327–33.
 99. Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: Biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res*. 2011;109(8):923–40.
 100. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, et al. Marrow-Derived Stromal Cells Express Genes Encoding a Broad Spectrum of Arteriogenic Cytokines and Promote In Vitro and In Vivo Arteriogenesis Through Paracrine Mechanisms. *Circ Res*. 2004;94(5):678–85.
 101. Uemura R, Xu M, Ahmad N, Ashraf M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ Res*. 2006;98(11):1414–21.
 102. Wen Z, Zheng S, Zhou C, Wang J, Wang T. Repair mechanisms of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *J Cell Mol Med*. 2011;15(5):1032–43.
 103. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Shou M, Lee CW, Barr S, et al. Local Delivery of Marrow-Derived Stromal Cells Augments Collateral Perfusion Through Paracrine Mechanisms. *Circulation*. 2004;109(12):1543–9.
 104. Mirotsoiu M, Zhang Z, Deb A, Zhang L, Gneccchi M, Noiseux N, et al. Secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) is the key Akt-mesenchymal stem cell-released paracrine factor mediating myocardial survival and repair. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(5):1643–8.
 105. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*. 2006;20(5):847–56.
 106. Gneccchi M, Danieli P, Cervio E. Mesenchymal stem cell therapy for heart disease. *Vascul Pharmacol*. 2012;57(1):48–55.
 107. Silva G V., Litovsky S, Assad JAR, Sousa ALS, Martin BJ, Vela D, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation*. 2005;111(2):150–6.
 108. Noiseux N, Gneccchi M, Lopez-Ilasaca M, Zhang L, Solomon SD, Deb A, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther*. 2006;14(6):840–50.
 109. Alvarez-Dolado M, Pardo R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, et al. Fusion of bone-

- marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*. 2003;425(6961):968–73.
110. Shadrin IY, Yoon W, Li L, Shepherd N, Bursac N. Rapid fusion between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes yields electrically active, non-contractile hybrid cells. *Sci Rep*. 2015;5:12043.
 111. Xu M, Uemura R, Dai Y, Wang Y, Pasha Z, Ashraf M. In vitro and in vivo effects of bone marrow stem cells on cardiac structure and function. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;42(2):441–8.
 112. Cai M, Shen R, Song L, Lu M, Wang J, Zhao S, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BM-MSCs) Improve Heart Function in Swine Myocardial Infarction Model through Paracrine Effects. *Sci Rep*. 2016;6(28250):1–12.
 113. Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res*. 2010;107(7):913–22.
 114. Adamiak M, Cheng G, Bobis-Wozowicz S, Zhao L, Kedracka-Krok S, Samanta A, et al. Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Extracellular Vesicles Are Safer and More Effective for Cardiac Repair than iPSCs. *Circ Res*. 2017;122(2):296–309.
 115. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: Effects of dexamethasone and IL-1?? *J Cell Physiol*. 1996;166(3):585–92.
 116. Afzal M, Samanta A, Shah Z, Jeevanantham V, Abdel-Latif A, Zuba-Surma E, et al. Adult Bone Marrow Cell Therapy for Ischemic Heart Disease: Evidence and Insights from Randomized Controlled Trials. 2015;117(6):558–75.
 117. Hong KU, Li Q-H, Guo Y, Patton NS, Moktar A, Bhatnagar A, et al. A highly sensitive and accurate method to quantify absolute numbers of c-kit+ cardiac stem cells following transplantation in mice. *Basic Res Cardiol*. 2013;108(3):346.
 118. Guo Y, Wysoczynski M, Nong Y, Tomlin A, Zhu X, Gumpert AM, et al. Repeated doses of cardiac mesenchymal cells are therapeutically superior to a single dose in mice with old myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2017;112(2):18.
 119. Strauer BE, Steinhoff G. 10 years of intracoronary and intramyocardial bone marrow stem cell therapy of the heart: From the methodological origin to clinical practice. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(11):1095–104.
 120. Cleland JGF, Bunting K V., Flather MD, Altman DG, Holmes J, Coats AJS, et al. Beta-blockers for heart failure with reduced, mid-range, and preserved ejection fraction: An individual patient-level analysis of double-blind randomized trials. *Eur Heart J*. 2018;39(1):26–35.
 121. van Loon RB, Veen G, Kamp O, Baur LHB, van Rossum AC. Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction: The influence of viability and revascularization - an echocardiographic substudy of the VIAMI-trial. *Trials*. 2014;15(329).
 122. Holme PA, Ørvim U, Hamers MJAG, Solum NO, Brosstad FR, Barstad RM, et al. Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17(4):646–53.
 123. Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience*. 2015;65(8):783–97.
 124. Doeppner TR, Herz J, Görgens A, Schlechter J, Ludwig A-K, Radtke S, et al. Extracellular Vesicles Improve Post-Stroke Neuroregeneration and Prevent Postischemic Immunosuppression. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4(10):1131–43.
 125. Njock M-S, Boudreau E, Roufaiel M, Cybulsky MI, Schober A, Fish JE. Endothelial cells suppress monocyte activation through secretion of extracellular vesicles containing anti-inflammatory microRNAs. *Blood*. 2015;125(20):3202–13.

126. Collino F, Pomatto M, Bruno S, Lindoso RS, Tapparo M, Sicheng W, et al. Exosome and Microvesicle-Enriched Fractions Isolated from Mesenchymal Stem Cells by Gradient Separation Showed Different Molecular Signatures and Functions on Renal Tubular Epithelial Cells. *Stem Cell Rev Reports*. 2017;13(2):226–43.
127. Osteikoetxea X, Balogh A, Szabó-Taylor K, Németh A, Szabó TG, Pálóczi K, et al. Improved characterization of EV preparations based on protein to lipid ratio and lipid properties. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121184.
128. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: A Compendium for Extracellular Vesicles with Continuous Community Annotation. *PLoS Biol*. 2012;10(12):e1001450.
129. Crescitelli R, Lässer C, Szabó TG, Kittel A, Eldh M, Dianzani I, et al. Distinct RNA profiles in subpopulations of extracellular vesicles: Apoptotic bodies, microvesicles and exosomes. *J Extracell Vesicles*. 2013;2(20677).
130. Yáñez-Mó M, Siljander PRM, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4(2015):1–60.
131. Atkin-Smith GK, Paone S, Zanker DJ, Duan M, Phan TK, Chen W, et al. Isolation of cell type-specific apoptotic bodies by fluorescence-activated cell sorting. *Sci Rep*. 2017;7(39846).
132. Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P, et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *J Cell Sci*. 2013;126(24):5553–65.
133. Bebelman MP, Smit MJ, Pegtel DM, Baglio SR. Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer. *Pharmacology and Therapeutics*. 2018;188:1-18.
134. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(2):193–208.
135. Villarroya-Beltri C, Baixauli F, Mittelbrunn M, Fernández-Delgado I, Torralba D, Moreno-Gonzalo O, et al. ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins. *Nat Commun*. 2016;7(13588).
136. Villarroya-Beltri C, Guerra S, Sánchez-Madrid F. ISGylation – a key to lock the cell gates for preventing the spread of threats. *J Cell Sci*. 2017;130(18):2961–9.
137. Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, et al. *Podstawy biologii komórki*. 2005. Wydawnictwo Naukowe PWN. 2005.
138. Hyenne V, Apaydin A, Rodriguez D, Spiegelhalter C, Hoff-Yoessle S, Diem M, et al. RAL-1 controls multivesicular body biogenesis and exosome secretion. *J Cell Biol*. 2015;211(1):27–37.
139. Pelham HRB. SNAREs and the specificity of membrane fusion. *Trends Cell Biol*. 2001;11(3):99–101.
140. Mears R, Craven RA, Hanrahan S, Totty N, Upton C, Young SL, et al. Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. 2004;4(12):4019–31.
141. Sun Y, Huo C, Qiao Z, Shang Z, Uzzaman A, Liu S, et al. Comparative Proteomic Analysis of Exosomes and Microvesicles in Human Saliva for Lung Cancer. *J Proteome Res*. 2018;17(3):1101–7.
142. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B, et al. Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes. *Proc Natl Acad Sci*. 2016;113(8):E968–77.
143. Keerthikumar S, Chisanga D, Ariyaratne D, Al Saffar H, Anand S, Zhao K, et al. ExoCarta: A Web-Based Compendium of Exosomal Cargo. *J Mol Biol*. 2016;428(4):688–92.
144. LAULAGNIER K, MOTTA C, HAMDI S, ROY S, FAUVELLE F, PAGEAUX J-F, et al. Mast cell-

- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem J.* 2004;380(1):161–71.
145. Bobis-Wozowicz S, Kmiolek K, Kania K, Karnas E, Labeledz-Maslowska A, Sekula M, et al. Diverse impact of xeno-free conditions on biological and regenerative properties of hUC-MSCs and their extracellular vesicles. *J Mol Med.* 2017;95(2):205–20.
 146. Fatima F, Nawaz M. Vesiculated Long Non-Coding RNAs: Offshore Packages Deciphering Trans-Regulation between Cells, Cancer Progression and Resistance to Therapies. *Non-Coding RNA.* 2017;3(1):10.
 147. Tricarico C, Clancy J, D'Souza-Schorey C. Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases.* 2017;8(4):220–32.
 148. McMahon HT, Boucrot E. Membrane curvature at a glance. *J Cell Sci.* 2015;128(6):1065–70.
 149. Fox JEB, Austin CD, Boyles JK, Steffen PK. Role of the membrane skeleton in preventing the shedding of procoagulant-rich microvesicles from the platelet plasma membrane. *J Cell Biol.* 1990;111(2):483–93.
 150. Fox JEB, Austin CD, Reynolds CC, Steffen PK. Evidence that agonist-induced activation of calpain causes the shedding of procoagulant-containing microvesicles from the membrane of aggregating platelets. *J Biol Chem.* 1991;266(20):13289–95.
 151. Leroyer AS, Isobe H, Lesèche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, et al. Cellular Origins and Thrombogenic Activity of Microparticles Isolated From Human Atherosclerotic Plaques. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(7):772–7.
 152. Abid Hussein MN, Meesters EW, Osmanovic N, Romijn FPHTM, Nieuwland R, Sturk A. Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection ex vivo. *J Thromb Haemost.* 2003;1(11):2434–43.
 153. Cosenza S, Ruiz M, Toupet K, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal stem cells derived exosomes and microparticles protect cartilage and bone from degradation in osteoarthritis. *Sci Rep.* 2017;7(16214).
 154. Kim HS, Choi DY, Yun SJ, Choi SM, Kang JW, Jung JW, et al. Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *J Proteome Res.* 2012;11(2):839–49.
 155. Surman M, Stępień E, Hoja-Lukowicz D, Przybyło M. Deciphering the role of ectosomes in cancer development and progression: focus on the proteome. *Clin Exp Metastasis.* 2017;34(3–4):273–89.
 156. Dean WL, Lee MJ, Cummins TD, Schultz DJ, Powell DW, Dean B. Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes. *Thromb Haemost.* 2009;102(4):711–8.
 157. Rozmyslowicz T, Majka M, Kijowski J, Murphy SL, Conover DO, Poncz M, et al. Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *AIDS.* 2003;17(1):33–42.
 158. Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, et al. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2008;10:619–24.
 159. Kalra H, Drummen GPC, Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. *Int J Mol Sci.* 2016;17(2):170.
 160. Weerheim AM, Kolb AM, Sturk A, Nieuwland R. Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography. *Anal Biochem.* 2002;302(2):191–8.
 161. Collino F, Deregibus MC, Bruno S, Sterpone L, Aghemo G, Viltono L, et al. Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS One.* 2010;5(7):e11803.
 162. Chen TS, Lai RC, Lee MM, Choo ABH, Lee CN, Lim SK. Mesenchymal stem cell secretes

- microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 2009;38(1):215–24.
163. Tomasoni S, Longaretti L, Rota C, Morigi M, Conti S, Gotti E, et al. Transfer of Growth Factor Receptor mRNA Via Exosomes Unravels the Regenerative Effect of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 2013;22(5):772–80.
 164. Keerthikumar S, Gangoda L, Liem M, Fonseka P, Atukorala I, Ozcitti C, et al. Proteogenomic analysis reveals exosomes are more oncogenic than ectosomes. *Oncotarget.* 2015;6(17):15375–96.
 165. Minciocchi VR, You S, Spinelli C, Morley S, Zandian M, Aspuria P-J, et al. Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles. *Oncotarget.* 2015;6(13):11327–41.
 166. Lotvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzas EI, Vizio D Di, Gardiner C, et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2014;3(1):1–6.
 167. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötval J, et al. Standardization of sample collection , isolation and analysis methods in extracellular vesicle research Need for standardization ISEV 2012 workshop on evRNA. *J Extracell Vesicles.* 2014;2(2013):1–29.
 168. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol.* 1967;13(3):269–88.
 169. Gebraad A, Kornilov R, Kaur S, Miettinen S, Haimi S, Peltoniemi H, et al. Monocyte-derived extracellular vesicles stimulate cytokine secretion and gene expression of matrix metalloproteinases by mesenchymal stem/stromal cells. *FEBS J.* 2018;285(12):2337–59.
 170. Barry OP, Praticò D, Lawson JA, FitzGerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest.* 1997;99(9):2118–27.
 171. Andrews RK, Berndt MC. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res.* 2004;114(5–6 SPEC. ISS.):447–53.
 172. Barry OP, Praticò D, Savani RC, FitzGerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest.* 1998;102(1):136–44.
 173. Sarkar A, Mitra S, Mehta S, Raices R, Wewers MD. Monocyte derived microvesicles deliver a cell death message via encapsulated caspase-1. *PLoS One.* 2009;4(9):e7140.
 174. Yuan A, Farber EL, Rapoport AL, Tejada D, Deniskin R, Akhmedov NB, et al. Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PLoS One.* 2009;4(3):e4722.
 175. Chen J, Li C, Chen L. The role of microvesicles derived from mesenchymal stem cells in lung diseases. *Biomed Res Int.* 2015;2015(985814):1–6.
 176. Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21(4):575–81.
 177. Fong MY, Zhou W, Liu L, Alontaga AY, Chandra M, Ashby J, et al. Breast-cancer-secreted miR-122 reprograms glucose metabolism in premetastatic niche to promote metastasis. *Nat Cell Biol.* 2015;17(2):183–94.
 178. Arraud N, Linares R, Tan S, Gounou C, Pasquet JM, Mornet S, et al. Extracellular vesicles from blood plasma: Determination of their morphology, size, phenotype and concentration. *J Thromb Haemost.* 2014;12(5):614–27.
 179. Keller S, Rupp C, Stoeck A, Runz S, Fogel M, Lugert S, et al. CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney Int.* 2007;72(9):1095–102.
 180. Asea A, Jean-Pierre C, Kaur P, Rao P, Linhares IM, Skupski D, et al. Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *J Reprod Immunol.* 2008;79(1):12–7.
 181. Stik G, Crequit S, Petit L, Durant J, Charbord P, Jaffredo T, et al. Extracellular vesicles of stromal

- origin target and support hematopoietic stem and progenitor cells. *J Cell Biol.* 2017;216(7):2217–30.
182. Mack M, Kleinschmidt A, Brühl H, Klier C, Nelson PJ, Cihak J, et al. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane- derived microparticles: A mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat Med.* 2000;6(7):769–75.
 183. Smith VL, Cheng Y, Bryant BR, Schorey JS. Exosomes function in antigen presentation during an in vivo *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Sci Rep.* 2017;7(43578):1–12.
 184. Denzer K, van Eijk M, Kleijmeer MJ, Jakobson E, de Groot C, J. Geuze H. Follicular Dendritic Cells Carry MHC Class II-Expressing Microvesicles at Their Surface. *J Immunol.* 2000;165(3):1259–65.
 185. Chiabotto G, Bruno S, Collino F, Camussi G. Mesenchymal stromal cells epithelial transition induced by renal tubular cells-derived extracellular vesicles. *PLoS One.* 2016;11(7):e0159163.
 186. Malik ZA, Kott KS, Poe AJ, Kuo T, Chen L, Ferrara KW, et al. Cardiac myocyte exosomes: stability, HSP60, and proteomics. *AJP Hear Circ Physiol.* 2013;304(7):H954–65.
 187. Vrijssen KR, Sluijter JPG, Schuchardt MWL, van Balkom BWM, Noort WA, Chamuleau SAJ, et al. Cardiomyocyte progenitor cell-derived exosomes stimulate migration of endothelial cells. Vol. 14, *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2010;14(5):1064–70.
 188. Loyer X, Zlatanova I, Devue C, Yin M, Howangyin K-Y, Klaihmon P, et al. Intra-Cardiac Release of Extracellular Vesicles Shapes Inflammation Following Myocardial Infarction. *Circ Res.* 2018;123(1):100–6.
 189. Zheng Y, Liu L, Chen C, Ming P, Huang Q, Li C, et al. The extracellular vesicles secreted by lung cancer cells in radiation therapy promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-23a. *PeerJ.* 2017;5:e3627.
 190. Anderson JD, Johansson HJ, Graham CS, Vesterlund M, Pham MT, Bramlett CS, et al. Comprehensive Proteomic Analysis of Mesenchymal Stem Cell Exosomes Reveals Modulation of Angiogenesis via NFkB Signaling. *Stem Cells.* 2016;34(3):601–13.
 191. Bruno S, Grange C, Collino F, Deregibus MC, Cantaluppi V, Biancone L, et al. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury. *PLoS One.* 2012;7(3):e33115.
 192. Haga H, Yan IK, Borrelli DA, Matsuda A, Parasramka M, Shukla N, et al. Extracellular vesicles from bone marrow-derived mesenchymal stem cells protect against murine hepatic ischemia/reperfusion injury. *Liver Transplant.* 2017;23(6):791–803.
 193. Zhu Y-G, Feng X-M, Abbott J, Fang X-H, Hao Q, Monsel A, et al. Human Mesenchymal Stem Cell Microvesicles for Treatment of Escherichia coli Endotoxin-Induced Acute Lung Injury in Mice. *Stem Cells.* 2014;32(1):116–25.
 194. Bian S, Zhang L, Duan L, Wang X, Min Y, Yu H. Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. *J Mol Med (Berl).* 2014;92(4):387–97.
 195. Barile L, Lionetti V, Cervio E, Matteucci M, Gherghiceanu M, Popescu LM, et al. Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2014;103(4):530–41.
 196. Arslan F, Lai RC, Smeets MB, Akeroyd L, Choo A, Aguor ENE, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res.* 2013;10(3):301–12.
 197. Koniusz S, Andrzejewska A, Muraca M, Srivastava AK, Janowski M, Lukomska B. Extracellular Vesicles in Physiology, Pathology, and Therapy of the Immune and Central Nervous System, with Focus on Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells as Therapeutic Tools. *Front Cell Neurosci.* 2016;10:109.

198. Cui LL, Kerkelä E, Bakreen A, Nitzsche F, Andrzejewska A, Nowakowski A, et al. The cerebral embolism evoked by intra-arterial delivery of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells in rats is related to cell dose and infusion velocity. *Stem Cell Res Ther.* 2015;6(1):11.
199. Soleimani M, Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat Protoc.* 2009;4(1):102–6.
200. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–54.
201. Hardij J, Cecchet F, Berquand A, Gheldof D, Chatelain C, Mullier F, et al. Characterisation of tissue factor-bearing extracellular vesicles with AFM: Comparison of air-tapping-mode AFM and liquid peak force AFM. *J Extracell Vesicles.* 2013;2(1):1–9.
202. Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M, Wi JR. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods.* 2009;6(5):359–62.
203. Wiśniewski JR, Duś K, Mann M. Proteomic workflow for analysis of archival formalin-fixed and paraffin-embedded clinical samples to a depth of 10000 proteins. *Proteomics - Clin Appl.* 2013;7(3–4):225–33.
204. Rappsilber J, Ishihama Y, Mann M. Stop And Go Extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem.* 2003;75(3):663–70.
205. Käll L, Canterbury JD, Weston J, Noble WS, MacCoss MJ. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat Methods.* 2007;4(11):923–5.
206. Desjardins P, Conklin D. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids 2 . High-Sensitivity Microvolume Nucleic Acid Quantitation Using the NanoDrop 3300. *Jove.* 2010;45(November):1–4.
207. Mantel PY, Hjelmqvist D, Walch M, Kharoubi-Hess S, Nilsson S, Ravel D, et al. Infected erythrocyte-derived extracellular vesicles alter vascular function via regulatory Ago2-miRNA complexes in malaria. *Nat Commun.* 2016;7(12727):1–15.
208. Decicco-skinner KL, Henry GH, Cataisson C, Tabib T, Gwilliam JC, Watson NJ, et al. Endothelial Cell Tube Formation Assay for the In Vitro Study of Angiogenesis. *J Vis Exp.* 2014;10:1–8.
209. Blom JN, Lu X, Arnold P, Feng Q. Myocardial Infarction in Neonatal Mice, A Model of Cardiac Regeneration. *J Vis Exp.* 2016;(111):1–12.
210. Niiyama H, Huang NF, Rollins MD, Cooke JP. Murine Model of Hindlimb Ischemia. *J Vis Exp.* 2009;(23):1–4.
211. Hoff J. Methods of Blood Collection in the Mouse. *Lab Anim (NY).* 2000;29(10):47–53.
212. Dragovic RA, Gardiner C, Brooks AS, Tannetta DS, Ferguson DJP, Hole P, et al. Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2011;7(6):780–8.
213. Van Der Pol E, Hoekstra AG, Sturk A, Otto C, Van Leeuwen TG, Nieuwland R. Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost.* 2010;8(12):2596–607.
214. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Grange C, Fonsato V. Exosomes/microvesicle-mediated epigenetic reprogramming of cells. *Cancer Res.* 2011;71(1):98–110.
215. Todorova D, Simoncini S, Lacroix R, Sabatier F, Dignat-George F. Extracellular vesicles in angiogenesis. *Circ Res.* 2017;120(10):1658–73.
216. Birnbaumer L. The discovery of signal transduction by G proteins. A personal account and an overview of the initial findings and contributions that led to our present understanding. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes.* 2007;1768(4):756–71.

217. Senbanjo LT, Chellaiah MA. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front Cell Dev Biol.* 2017;5(18):1–6.
218. Fujisaki T, Tanaka Y, Fujii K, Mine S, Saito K, Amada S, et al. CD44 stimulation induces integrin-mediated adhesion of colon cancer cell lines to endothelial cells by up-regulation of integrins and c-Met and activation of integrins. *Cancer Res.* 1999;59(17):4427–34.
219. Tamma R, Ribatti D. Bone niches, hematopoietic stem cells, and vessel formation. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1):151.
220. Xu X, Wu J, Li S, Hu Z, Xu X, Zhu Y, et al. Downregulation of microRNA-182-5p contributes to renal cell carcinoma proliferation via activating the AKT/FOXO3a signaling pathway. *Mol Cancer.* 2014;13(1):1–11.
221. Weber CEM, Luo C, Hotz-Wagenblatt A, Gardyan A, Kordaß T, Holland-Letz T, et al. miR-339-3p is a tumor suppressor in melanoma. *Cancer Res.* 2016;76(12):3562–71.
222. Khatun Z, Sharma A. Exosome Signalling in Stem Cells. *Stem Cell Fundam Pract.* 2016;2(2):1.
223. Chen JJ, Zhou SH. Mesenchymal stem cells overexpressing MiR-126 enhance ischemic angiogenesis via the AKT/ERK-related pathway. *Cardiol J.* 2011;18(6):675–81.
224. Liu X, Tong Z, Chen K, Hu X, Jin H, Hou M. The Role of miRNA-132 against Apoptosis and Oxidative Stress in Heart Failure. *Biomed Res Int.* 2018;3452748:1–9.
225. Seok JK, Lee SH, Kim MJ, Lee YM. MicroRNA-382 induced by HIF-1 α is an angiogenic miR targeting the tumor suppressor phosphatase and tensin homolog. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(12):8062–72.
226. Szmítko PE. New Markers of Inflammation and Endothelial Cell Activation: Part I. *Circulation.* 2003;108(16):1917–23.
227. Penvose A, Westerman KA. Sca-1 is involved in the adhesion of myosphere cells to V 3 integrin. *Biol Open.* 2012;1(9):839–47.
228. Morbidelli L, Donnini S, Ziche M. Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. *Curr Pharm Des.* 2003;9(7):521–30.
229. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol.* 2014;24(10):R453–62.
230. Chen Z, Bakhshi FR, Shajahan AN, Sharma T, Mao M, Trane A, et al. Nitric oxide-dependent Src activation and resultant caveolin-1 phosphorylation promote eNOS/caveolin-1 binding and eNOS inhibition. *Mol Biol Cell.* 2012;23(7):1388–98.
231. Rutkowski JM. Characterization of lymphangiogenesis in a model of adult skin regeneration. *AJP Hear Circ Physiol.* 2006;291(3):H1402–H1410.
232. Bellingham SA, Coleman BM, Hill AF. Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(21):10937–49.
233. Llorente A, Skotland T, Sylvänne T, Kauhanen D, Róg T, Orlowski A, et al. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids.* 2013;1831(7):1302–9.
234. Dabrowski FA, Burdzinska A, Kulesza A, Sladowska A, Zolocińska A, Gala K, et al. Comparison of the paracrine activity of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord, amniotic membrane and adipose tissue. *J Obstet Gynaecol Res.* 2017;43(11):1758–1768.
235. Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant.* 2016;25(5):829–48.
236. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, et al.

- Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transcatheter injection in patients with ischemic cardiomyopathy: The POSEIDON randomized trial. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2012;308(22):2369–79.
237. Yubo M, Yanyan L, Li L, Tao S, Bo L, Lin C. Clinical efficacy and safety of mesenchymal stem cell transplantation for osteoarthritis treatment: A meta-analysis. *PLoS One.* 2017;12(4):e0175449.
 238. Jeong H, Yim HW, Park HJ, Cho Y, Hong H, Kim NJ, et al. Mesenchymal stem cell therapy for ischemic heart disease: Systematic review and meta-analysis. *Int J Stem Cells.* 2018;11(1):1–12.
 239. Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, Fergusson D, Winston BW, Marshall JC, et al. Safety of Cell Therapy with Mesenchymal Stromal Cells (SafeCell): A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *PLoS One.* 2012;7(10):e47559.
 240. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999;85(3):221–228.
 241. Nombela-Arrieta C, Pivarnik G, Winkel B, Canty KJ, Harley B, Mahoney JE, et al. Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat Cell Biol.* 2013;15:533–43.
 242. Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Wojakowski W, Ratajczak J, Kucia M. Bone marrow - Home of versatile stem cells. *Transfus Med Hemotherapy.* 2008;35(3):248–59.
 243. Lech W, Figiel-Dabrowska A, Sarnowska A, Drela K, Obtulowicz P, Noszczyk BH, et al. Phenotypic, Functional, and Safety Control at Preimplantation Phase of MSC-Based Therapy. *Stem Cells Int.* 2016;2016(2514917):1–14.
 244. Hu Y, Lou B, Wu X, Wu R, Wang H, Gao L, et al. Comparative Study on In Vitro Culture of Mouse Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2018;2018(6704583):1–15.
 245. Labedz-Maslowska A, Lipert B, Berdecka D, Kedracka-Krok S, Jankowska U, Kamycka E, et al. Monocyte Chemoattractant Protein-Induced Protein 1 (MCP1) Enhances Angiogenic and Cardiomyogenic Potential of Murine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. Qin G, editor. *PLoS One.* 2015;10(7):e0133746.
 246. Tomlinson MJ, Tomlinson S, Yang XB, Kirkham J. Cell separation: Terminology and practical considerations. *J Tissue Eng.* 2013;4(2041731412472690):1–14.
 247. Kekkarainen T, Mannelin S, Laine J, Jaatinen T. Optimization of immunomagnetic separation for cord blood-derived hematopoietic stem cells. *BMC Cell Biol.* 2006;7(30).
 248. Li Q, Zhang X, Peng Y, Chai H, Xu Y, Wei J, et al. Comparison of the sorting efficiency and influence on cell function between the sterile flow cytometry and immunomagnetic bead purification methods. *Prep Biochem Biotechnol.* 2013;43(2):197–206.
 249. Sicco C Lo, Reverberi D, Balbi C, Ulivi V, Principi E, Pascucci L, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles as mediators of anti-inflammatory effects: Endorsement of macrophage polarization. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(3):1018–28.
 250. Eirin A, Zhu X-Y, Puranik AS, Woollard JR, Tang H, Dasari S, et al. Comparative proteomic analysis of extracellular vesicles isolated from porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Sci Rep.* 2016;6(1):36120.
 251. Ramos TL, Sánchez-Abarca LI, Muntión S, Preciado S, Puig N, López-Ruano G, et al. MSC surface markers (CD44, CD73, and CD90) can identify human MSC-derived extracellular vesicles by conventional flow cytometry. *Cell Commun Signal.* 2016;14(1).
 252. Eitan E, Zhang S, Witwer KW, Mattson MP. Extracellular vesicle-depleted fetal bovine and human sera have reduced capacity to support cell growth. *J Extracell Vesicles.* 2015;4(2015):1–10.
 253. Van Deun J, Mestdagh P, Sormunen R, Cocquyt V, Vermaelen K, Vandesompele J, et al. The impact of disparate isolation methods for extracellular vesicles on downstream RNA profiling. *J Extracell*

- Vesicles. 2014;3(1).
254. Bobis-Wozowicz S, Kmiotek K, Sekula M, Kedracka-Krok S, Kamycka E, Adamiak M, et al. Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Microvesicles Transmit RNAs and Proteins to Recipient Mature Heart Cells Modulating Cell Fate and Behavior. *Stem Cells*. 2015;33(9):2748–61.
 255. Vogel R, Coumans FAW, Maltesen RG, Böing AN, Bonnington KE, Broekman ML, et al. A standardized method to determine the concentration of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing. *J Extracell Vesicles*. 2016;5(1).
 256. Maas SLN, De Vrij J, Broekman MLD. Quantification and Size-profiling of Extracellular Vesicles Using Tunable Resistive Pulse Sensing. *J Vis Exp*. 2014;(92):e51623.
 257. Bobis-Wozowicz S, Kmiotek K, Kania K, Karnas E, Labedz-Maslowska A, Sekula M, et al. Diverse impact of xeno-free conditions on biological and regenerative properties of hUC-MSCs and their extracellular vesicles. *J Mol Med*. 2017;95(2).
 258. Goodison S, Urquidí V, Tarin D. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol*. 1999;52(4):189–96.
 259. Soleti R, Benameur T, Porro C, Panaro MA, Andriantsitohaina R, Martínez MC. Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis*. 2009;30(4):580–8.
 260. Pink D, Donnelier J, Lewis J, Braun JEA. Cargo-Loading of Misfolded Proteins into Extracellular Vesicles: The Role of J Proteins. *bioRxiv* [Internet]. 2018; Available from: <https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2018/05/08/310219.full.pdf>
 261. Katz M, Amit I, Yarden Y. Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2007;1773(8):1161–76.
 262. Giles FJ. The vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway: a therapeutic target in patients with hematologic malignancies. *Oncologist*. 2001;6(suppl 5):32–9.
 263. Cheung SMS, Ostergaard HL. Pyk2 Controls Integrin-Dependent CTL Migration through Regulation of De-Adhesion. *J Immunol*. 2016;197(5):1945–56.
 264. Xie H, Wang Z, Zhang L, Lei Q, Zhao A, Wang H, et al. Extracellular Vesicle-functionalized Decalcified Bone Matrix Scaffolds with Enhanced Pro-angiogenic and Pro-bone Regeneration Activities. *Sci Rep*. 2017;7:45622.
 265. Chen Y, Gorski DH. Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood*. 2008;111(3):1217–26.
 266. Tétreault N, De Guire V. MiRNAs: Their discovery, biogenesis and mechanism of action. *Clin Biochem*. 2013;45(10–11):842–5.
 267. Qu M, Pan J, Shi X, Zhang Z, Tang Y, Yang G. MicroRNA-126 is a prospective target for vascular disease. *Neuroimmunol Neuroinflammation*. 2018;5(10):1–7.
 268. Yilbas AE, Hamilton A, Wang Y, Mach H, Lacroix N, Davis DR, et al. Activation of GATA4 gene expression at the early stage of cardiac specification. *Front Chem*. 2014;2(12).
 269. Sun Z, Yang S, Zhou Q, Wang G, Song J, Li Z, et al. Emerging role of exosome-derived long non-coding RNAs in tumor microenvironment. *Mol Cancer*. 2018;17(82):1–9.
 270. Subra C, Laulagnier K, Perret B, Record M. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie*. 2007;89(2):205–12.
 271. Meller VH, Joshi SS, Deshpande N. Modulation of Chromatin by Noncoding RNA. *Annu Rev Genet*. 2015;49(1):673–95.
 272. Skotland T, Sandvig K, Llorente A. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog Lipid Res*. 2017;66:30–41.

273. Costa Verdera H, Gitz-Francois JJ, Schiffelers RM, Vader P. Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *J Control Release*. 2017;266(September):100–8.
274. Long EO. Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1): Getting a Grip on Leukocyte Adhesion. 2011;186(9):1–5.
275. Chigaev A, Wu Y, Williams DB, Smagley Y, Sklar LA. Discovery of Very Late Antigen-4 (VLA-4, $\alpha 4\beta 1$ integrin) allosteric antagonists. *J Biol Chem*. 2011;286(7):5455–63.
276. Varki A. Selectin ligands. *Proc Natl Acad Sci*. 1994;91(16):7390–7.
277. Yoshio K. Selective E-selectin ligands. *Blood*. 2013;122(24):3858–61.
278. Sahin AO, Buitenhuis M. Molecular mechanisms underlying adhesion and migration of hematopoietic stem cells. *Cell Adh Migr*. 2012;6(1):39–48.
279. Wetzel A, Chavakis T, Preissner KT, Sticherling M, Hausteiner U-F, Anderegg U, et al. Human Thy-1 (CD90) on Activated Endothelial Cells Is a Counterreceptor for the Leukocyte Integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Immunol*. 2004;172(6):3850–9.
280. Xiao Q, Zeng L, Zhang Z, Margariti A, Ali ZA, Channon KM, et al. Sca-1+ progenitors derived from embryonic stem cells differentiate into endothelial cells capable of vascular repair after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(10):2244–51.
281. Li C, Hu Y, Deng X, Shen X, Mao N, Xiong T, et al. Anti-apoptotic roles of MicroRNA-21 via activating PTEN/PI3K/Akt pathway in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017;10(4):4339–47.
282. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(1):49–63.
283. Wiklander OPB, Nordin JZ, O’Loughlin A, Gustafsson Y, Corso G, Mäger I, et al. Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *J Extracell Vesicles*. 2015;4(2015):1–13.
284. Schmuck EG, Koch JM, Centanni JM, Hacker TA, Braun RK, Eldridge M, et al. Biodistribution and Clearance of Human Mesenchymal Stem Cells by Quantitative Three-Dimensional Cryo-Imaging After Intravenous Infusion in a Rat Lung Injury Model. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(12):1668–75.
285. Grange C, Tapparo M, Bruno S, Chatterjee D, Quesenberry PJ, Tetta C, et al. Biodistribution of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of acute kidney injury monitored by optical imaging. *Int J Mol Med*. 2014;33(5):1055–63.
286. Otero-Ortega L, Laso-García F, Del Carmen Gómez-De Frutos M, Rodríguez-Frutos B, Pascual-Guerra J, Fuentes B, et al. White matter repair after extracellular vesicles administration in an experimental animal model of subcortical stroke. *Sci Rep*. 2017;7(March):1–11.
287. Lai CP, Mardini O, Ericsson M, Prabhakar S, Maguire CA, Chen JW, et al. Dynamic biodistribution of extracellular vesicles in vivo using a multimodal imaging reporter. *ACS Nano*. 2014;8(1):483–94.
288. Morishita M, Takahashi Y, Nishikawa M, Sano K, Kato K, Yamashita T, et al. Quantitative analysis of tissue distribution of the B16BL6-derived exosomes using a streptavidin-lactadherin fusion protein and Iodine-125-Labeled biotin derivative after intravenous injection in mice. *J Pharm Sci*. 2015;104(2):705–13.
289. Smyth T, Kullberg M, Malik N, Smith-Jones P, Graner MW, Anchordoquy TJ. Biodistribution and delivery efficiency of unmodified tumor-derived exosomes. *J Control Release*. 2015;199:145–55.
290. Chai R, Arslan F, May M, Siu N, Sze K, Choo A, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia / reperfusion injury. *Stem Cell Res*. 2010;4(3):214–22.
291. Karin M, Clevers H. Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration. *Nature*. 2016;529(7586):307–15.

292. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008;453:314–321.
293. Rosero O, Németh K, Turóczy Z, Fülöp A, Garbaisz D, Györfy A, et al. Collateral circulation of the rat lower limb and its significance in ischemia–reperfusion studies. *Surg Today*. 2013;44(12):2345–53.
294. Morbidelli L, Donnini S, Ziche M. Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. *Curr Pharm Des*. 2003;9(7):521-30.
295. Sdrimas K, Kourembanas S. MSC Microvesicles for the Treatment of Lung Disease: A New Paradigm for Cell-Free Therapy. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(13):1905–15.
296. Camussi G, Deregibus MC, Cantaluppi V. Role of stem-cell-derived microvesicles in the paracrine action of stem cells. *Biochem Soc Trans*. 2013;41(1):283–7.
297. Christiansen A, Detmar M. Lymphangiogenesis and Cancer. *Genes and Cancer*. 2011;2(12):1146–58.
298. Shao L, Zhang Y, Lan B, Wang J, Zhang Z, Zhang L, et al. MiRNA-Sequence Indicates That Mesenchymal Stem Cells and Exosomes Have Similar Mechanism to Enhance Cardiac Repair. *Biomed Res Int*. 2017;2017(4150705).
299. Lener T, Gimona M, Aigner L, Börger V, Buzas E, Camussi G, et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - An ISEV position paper. *J Extracell Vesicles*. 2015;4(1).
300. Gimona M, Pachler K, Laner-Plamberger S, Schallmoser K, Rohde E. Manufacturing of human extracellular vesicle-based therapeutics for clinical use. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6).

8. ZAŁĄCZNIKI

8.1. Tabele

Tabela 1. Lista białek zidentyfikowanych w preparatach MSC-EVs zaklasyfikowanych według procesu biologicznego jako białka zaangażowane w adhezję komórek. Analizę wykonano przy użyciu aplikacji Gene Ontology oraz wykorzystano wyłącznie białka zidentyfikowane w przynajmniej dwóch z trzech próbek na podstawie 2 lub większej liczby unikalnych peptydów.

Białka zaangażowane w adhezję komórek zidentyfikowane w preparatach MSC-EVs		
<i>L.p.</i>	<i>Kod UniProtKB</i>	<i>Nazwa oryginalna białka</i>
1	P14206	40S ribosomal protein SA
2	P21836	Acetylcholinesterase
3	P60710	Actin, cytoplasmic 1
4	Q7TPR4	Alpha-actinin-1
5	Q9R182	Angiopoietin-related protein 3
6	Q9ES46	Beta-parvin
7	Q9R0G6	Cartilage oligomeric matrix protein
8	P26231	Catenin alpha-1
9	Q02248	Catenin beta-1
10	P30999	Catenin delta-1
11	P15379	CD44 antigen
12	P41731	CD63 antigen
13	P40240	CD9 antigen
14	P60766	Cell division control protein 42 homolog
15	Q9Z1Q5	Chloride intracellular channel protein 1
16	P08121	Collagen alpha-1(III) chain
17	Q04857	Collagen alpha-1(VI) chain
18	Q60847	Collagen alpha-1(XII) chain
19	Q80X19	Collagen alpha-1(XIV) chain
20	O35206	Collagen alpha-1(XV) chain
21	Q02788	Collagen alpha-2(VI) chain
22	Q8CF98	Collectin-10
23	P29268	Connective tissue growth factor
24	P12960	Contactin-1
25	O89053	Coronin-1A
26	P97315	Cysteine and glycine-rich protein 1
27	O35474	EGF-like repeat and discoidin I-like domain-containing protein 3
28	P21995	Embrin
29	Q99K41	EMILIN-1
30	Q8K482	EMILIN-2
31	P54761	Ephrin type-B receptor 4
32	Q8K1B8	Fermitin family homolog 3
33	Q61554	Fibrillin-1
34	E9PV24	Fibrinogen alpha chain
35	Q8K0E8	Fibrinogen beta chain

36	Q8VCM7	Fibrinogen gamma chain
37	P11276	Fibronectin
38	Q8BTM8	Filamin-A
39	Q60634	Flotillin-2
40	Q6NVD0	FRAS1-related extracellular matrix protein 2
41	P16045	Galectin-1
42	Q07797	Galectin-3-binding protein
43	P14602	Heat shock protein beta-1
44	Q8BKG3	Inactive tyrosine-protein kinase 7
45	P70389	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit
46	P61622	Integrin alpha-11
47	Q00651	Integrin alpha-4
48	P11688	Integrin alpha-5
49	Q61739	Integrin alpha-6
50	Q9QUM0	Integrin alpha-IIb
51	P24063	Integrin alpha-L
52	P05555	Integrin alpha-M
53	P43406	Integrin alpha-V
54	P09055	Integrin beta-1
55	P11835	Integrin beta-2
56	O54890	Integrin beta-3
57	O70309	Integrin beta-5
58	O55222	Integrin-linked protein kinase
59	P21956	Lactadherin
60	Q60675	Laminin subunit alpha-2
61	P97927	Laminin subunit alpha-4
62	Q61001	Laminin subunit alpha-5
63	P02469	Laminin subunit beta-1
64	P02468	Laminin subunit gamma-1
65	Q99JW4	LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1
66	P26041	Moesin
67	Q3THE2	Myosin regulatory light chain 12B
68	Q61879	Myosin-10
69	Q8VDD5	Myosin-9
70	P97798	Neogenin
71	P13595	Neural cell adhesion molecule 1
72	P97333	Neuropilin-1
73	P10493	Nidogen-1
74	O88322	Nidogen-2
75	O35103	Osteomodulin
76	P10923	Osteopontin
77	O70400	PDZ and LIM domain protein 1
78	Q62009	Periostin
79	Q9JHG7	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma isoform
80	Q9JHK5	Pleckstrin
81	B2RXS4	Plexin-B2

82	P97321	Prolyl endopeptidase FAP
83	Q9QVP9	Protein-tyrosine kinase 2-beta
84	Q8BNA6	Protocadherin Fat 3
85	Q2PZL6	Protocadherin Fat 4
86	P63001	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
87	Q05144	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2
88	P61027	Ras-related protein Rab-10
89	P61226	Ras-related protein Rap-2b
90	P06800	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C
91	A2A8L5	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F
92	B0V2N1	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S
93	Q60841	Reelin
94	O55098	Serine/threonine-protein kinase 10
95	Q8BZ03	Serine/threonine-protein kinase D2
96	Q62230	Sialoadhesin
97	Q9R1B9	Slit homolog 2 protein
98	A2AVA0	Sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing protein 1
99	P26039	Talin-1
100	Q80YX1	Tenascin
101	P01831	Thy-1 membrane glycoprotein
102	P82198	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3
103	Q99JR5	Tubulointerstitial nephritis antigen-like
104	P29351	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6
105	Q64727	Vinculin
106	Q9Z0G4	WNT1-inducible-signaling pathway protein 2

Tabela II. Lista białek zidentyfikowanych w preparatach MSC-EVs zaklasyfikowanych według procesu biologicznego jako białka zaangażowane bądź regulujące proces angiogenezy. Analizę wykonano przy użyciu aplikacji Gene Ontology oraz wykorzystano wyłącznie białka zidentyfikowane w przynajmniej dwóch z trzech próbek na podstawie 2 lub większej liczby unikalnych peptydów.

Białka regulujące lub zaangażowane w angiogenezę zidentyfikowane w preparatach MSC-EVs		
<i>L.p.</i>	<i>Kod UniProtKB</i>	<i>Nazwa oryginalna białka</i>
1	Q99M51	Cytoplasmic protein NCK1
2	P23927	Alpha-crystallin B chain
3	P35235	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11
4	P42225	Signal transducer and activator of transcription 1
5	Q9JHG7	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma isoform
6	P63085	Mitogen-activated protein kinase 1
7	Q62219	Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein
8	P29351	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6
9	P14602	Heat shock protein beta-1
10	P47811	Mitogen-activated protein kinase 14

11	Q02248	Catenin beta-1
12	Q8CIH5	1-phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphodiesterase gamma-2
13	Q63844	Mitogen-activated protein kinase 3
14	P31938	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1
15	Q60631	Growth factor receptor-bound protein 2
16	Q8BZ03	Serine/threonine-protein kinase D2
17	P08556	GTPase NRas
18	P68404	Protein kinase C beta type

Tabela III. Lista białek zidentyfikowanych w preparatach MSC-EVs zaklasyfikowanych według procesu biologicznego jako białka zaangażowane bądź regulujące rozwój nowych naczyń krwionośnych. Analizę wykonano przy użyciu aplikacji Gene Ontology oraz wykorzystano wyłącznie białka zidentyfikowane w przynajmniej dwóch z trzech próbek na podstawie 2 lub większej liczby unikalnych peptydów.

Białka zaangażowane lub regulujące w rozwój nowych naczyń krwionośnych zidentyfikowane w preparatach MSC-EVs		
<i>L.p.</i>	<i>Kod UniProtKB</i>	<i>Nazwa oryginalna białka</i>
1	P08226	Apolipoprotein E
2	P11352	Glutathione peroxidase 1
3	Q8CG19	Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1
4	P06745	Glucose-6-phosphate isomerase
5	P54761	Ephrin type-B receptor 4
6	O88393	Transforming growth factor beta receptor type 3
7	Q91ZX7	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1
8	P01831	Thy-1 membrane glycoprotein
9	P07356	Annexin A2
10	P39054	Dynamin-2
11	Q64455	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta
12	Q9DBG3	AP-2 complex subunit beta
13	P58022	Lysyl oxidase homolog 2
14	O35375	Neuropilin-2
15	Q9JHG7	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma isoform
16	Q01149	Collagen alpha-2(I) chain
17	P46935	E3 ubiquitin-protein ligase NEDD4
18	P43406	Integrin alpha-V
19	P63085	Mitogen-activated protein kinase 1
20	Q8BTM8	Filamin-A
21	Q9QYB1	Chloride intracellular channel protein 4
22	P12815	Programmed cell death protein 6
23	P97321	Prolyl endopeptidase FAP
24	P97333	Neuropilin-1
25	Q8VHY0	Chondroitin sulfate proteoglycan 4
26	P47811	Mitogen-activated protein kinase 14
27	Q02248	Catenin beta-1
28	Q9QVP9	Protein-tyrosine kinase 2-beta

29	E9Q7X6	Protein HEG homolog 1
30	P09470	Angiotensin-converting enzyme
31	P02463	Collagen alpha-1(IV) chain
32	P31938	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1
33	P09405	Nucleolin
34	Q9R1B9	Slit homolog 2 protein
35	P97927	Laminin subunit alpha-4
36	Q8BKG3	Inactive tyrosine-protein kinase 7
37	P60766	Cell division control protein 42 homolog
38	P28301	Protein-lysine 6-oxidase
39	P29268	Connective tissue growth factor
40	P21956	Lactadherin
41	Q8BZ03	Serine/threonine-protein kinase D2
42	Q8BH43	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 2
43	P11276	Fibronectin
44	Q99P72	Reticulon-4
45	Q3UHN9	Bifunctional heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase 1
46	Q6ZPF4	Formin-like protein 3
47	P11087	Collagen alpha-1(I) chain
48	Q05793	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein
49	Q06806	Tyrosine-protein kinase receptor Tie-1
50	Q61879	Myosin-10
51	Q9R182	Angiopoietin-related protein 3
52	P09055	Integrin beta-1
53	P97449	Aminopeptidase N
54	Q61508	Extracellular matrix protein 1
55	Q8VDD5	Myosin-9
56	P27601	Guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13
57	E9Q414	Apolipoprotein B-100
58	P08121	Collagen alpha-1(III) chain
59	P56480	ATP synthase subunit beta, mitochondrial
60	Q61982	Neurogenic locus notch homolog protein 3

Tabela IV. Lista białek zidentyfikowanych w preparatach MSC-EVs zaklasyfikowanych według procesu biologicznego jako białka zaangażowane bądź regulujące proliferację komórek. Analizę wykonano przy użyciu aplikacji Gene Ontology oraz wykorzystano wyłącznie białka zidentyfikowane w przynajmniej dwóch z trzech próbek na podstawie 2 lub większej liczby unikalnych peptydów.

Białka regulujące lub zaangażowane w proliferację komórek zidentyfikowane w preparatach MSC-EVs		
<i>L.p.</i>	<i>Kod UniProtKB</i>	<i>Nazwa oryginalna białka</i>
1	P11352	Glutathione peroxidase 1
2	P61202	COP9 signalosome complex subunit 2
3	O88393	Transforming growth factor beta receptor type 3
4	Q91ZX7	Pro-low-density lipoprotein receptor-related protein 1
5	P08752	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2

6	P62874	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1
7	Q62192	CD180 antigen
8	P05555	Integrin alpha-M
9	P58022	Lysyl oxidase homolog 2
10	P63038	60 kDa heat shock protein, mitochondrial
11	P35700	Peroxiredoxin-1
12	P63085	Mitogen-activated protein kinase 1
13	Q00623	Apolipoprotein A-I
14	P11835	Integrin beta-2
15	P97321	Prolyl endopeptidase FAP
16	P61027	Ras-related protein Rab-10
17	Q9JM99	Proteoglycan 4
18	Q8VHY0	Chondroitin sulfate proteoglycan 4
19	P29351	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6
20	P63001	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
21	P82198	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3
22	Q02248	Catenin beta-1
23	Q9R0Q7	Prostaglandin E synthase 3
24	Q9DBC7	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit
25	P09470	Angiotensin-converting enzyme
26	P24547	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase 2
27	P31938	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1
28	Q3USZ8	Deleted in autism protein 1 homolog
29	P55264	Adenosine kinase
30	P29268	Connective tissue growth factor
31	P30993	C5a anaphylatoxin chemotactic receptor 1
32	P70698	CTP synthase 1
33	P24063	Integrin alpha-L
34	Q61879	Myosin-10
35	Q8C3J5	Dedicator of cytokinesis protein 2
36	B2RXS4	Plexin-B2
37	P06800	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C
38	P57716	Nicastrin
39	Q2PZL6	Protocadherin Fat 4
40	P28798	Granulins
41	P26041	Moesin
42	Q99JI6	Ras-related protein Rap-1b

Tabela V. Lista białek zidentyfikowanych wyłącznie w MSC-EVs. Analizę wykonano przy użyciu aplikacji Gene Ontology oraz wykorzystano wyłącznie białka zidentyfikowane w przynajmniej dwóch z trzech próbek na podstawie 2 lub większej liczby unikalnych peptydów.

Lista białek zidentyfikowanych wyłącznie w preparatach MSC-EVs		
L.p.	A Kod UniProtKB	Nazwa oryginalna białka
1	P16627	Heat shock 70 kDa protein 1-like
2	P51942	Cartilage matrix protein
3	P70352	Ecto-ADP-ribosyltransferase 5

4	Q8BH35	Complement component C8 beta chain
5	Q8R121	Protein Z-dependent protease inhibitor
6	Q9ES30	Complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3
7	P06909	Complement factor H
8	P52850	Bifunctional heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase 2
9	O89029	Matrilin-4
10	Q3U6Q4	Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 6
11	Q3V0K9	Plastin-1
12	Q8BHH2	Ras-related protein Rab-9B
13	O35367	Keratocan
14	O88200	C-type lectin domain family 11 member A
15	P16015	Carbonic anhydrase 3
16	P35802	Neuronal membrane glycoprotein M6-a
17	P47877	Insulin-like growth factor-binding protein 2
18	P97812	Indian hedgehog protein
19	Q06194	Coagulation factor VIII
20	Q9EQF5	Dihydropyrimidinase
21	O08677	Kininogen-1
22	O08858	Somatostatin receptor type 5
23	O35969	Guanidinoacetate N-methyltransferase
24	O54951	Semaphorin-6B
25	O70624	Myocilin
26	O88634	Proteinase-activated receptor 4
27	P07309	Transthyretin
28	P09535	Insulin-like growth factor II
29	P10648	Glutathione S-transferase A2
30	P26928	Hepatocyte growth factor-like protein
31	P49282	Natural resistance-associated macrophage protein 2
32	P52840	Sulfotransferase 1A1
33	P70274	Selenoprotein P
34	P70695	Fructose-1,6-bisphosphatase isozyme 2
35	Q3U1J0	Sodium-coupled neutral amino acid transporter 5
36	Q60997	Deleted in malignant brain tumors 1 protein
37	Q769J6	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13
38	Q80UE6	Serine/threonine-protein kinase WNK4
39	Q8BG09	Transmembrane protein 184B
40	Q8BJU2	Tetraspanin-9
41	Q8C3I9	Deleted in autism-related protein 1 homolog
42	Q8CEZ1	Single-pass membrane and coiled-coil domain-containing protein 1
43	Q8K1I3	Secreted phosphoprotein 24
44	Q8VCC9	Spondin-1
45	Q8VI56	Low-density lipoprotein receptor-related protein 4
46	Q91Y02	Protocadherin beta-18
47	Q91Y47	Coagulation factor XI
48	Q99P58	Ras-related protein Rab-27B
49	Q9CXF0	Kynureninase
50	Q9D6F9	Tubulin beta-4A chain

51	Q9DB75	Cell death-inducing p53-target protein 1
52	Q9JHI0	Matrix metalloproteinase-19
53	Q9JKX3	Transferrin receptor protein 2
54	Q62443	Neuronal pentraxin-1
55	A2AQ07	Tubulin beta-1 chain
56	Q9QXY6	EH domain-containing protein 3
57	P12960	Contactin-1
58	Q60675	Laminin subunit alpha-2
59	Q2PZL6	Protocadherin Fat 4
60	Q9WTZ2	Membrane-bound transcription factor site-1 protease
61	P0CG49	Polyubiquitin-B
62	Q61646	Haptoglobin
63	Q8R4V5	Oncoprotein-induced transcript 3 protein
64	O08710	Thyroglobulin
65	P06684	Complement C5
66	Q9R1B9	Slit homolog 2 protein
67	Q9R0G6	Cartilage oligomeric matrix protein
68	Q9WUB3	Glycogen phosphorylase, muscle form
69	Q62000	Mimecan
70	Q60841	Reelin
71	Q02357	Ankyrin-1
72	Q8CG03	cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase
73	Q9QUG9	RAS guanyl-releasing protein 2
74	P98064	Mannan-binding lectin serine protease 1
75	P97798	Neogenin
76	Q9Z1T2	Thrombospondin-4
77	Q8CG16	Complement C1r-A subcomponent
78	B0V2N1	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase S
79	Q6KAU4	Multivesicular body subunit 12B
80	P86048	60S ribosomal protein L10-like
81	Q8CF98	Collectin-10
82	Q8CHR6	Dihydropyrimidine dehydrogenase [NADP(+)]
83	O35490	Betaine—homocysteine S-methyltransferase 1
84	P09470	Angiotensin-converting enzyme
85	Q8CG85	MAM domain-containing protein 2
86	P00687	Alpha-amylase 1
87	Q3UHN9	Bifunctional heparan sulfate N-deacetylase/N-sulfotransferase 1
88	Q9JHH6	Carboxypeptidase B2
89	E9PV24	Fibrinogen alpha chain
90	Q61147	Ceruloplasmin
91	Q61001	Laminin subunit alpha-5
92	O70628	High affinity cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 9A
93	P35492	Histidine ammonia-lyase
94	P97927	Laminin subunit alpha-4
95	P07310	Creatine kinase M-type
96	O88947	Coagulation factor X
97	Q8R105	Vacuolar protein sorting-associated protein 37C

98	Q64374	Regucalcin
99	Q9R182	Angiopoietin-related protein 3
100	Q06806	Tyrosine-protein kinase receptor Tie-1
101	Q8BX43	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19L
102	Q9QUM0	Integrin alpha-IIb
103	Q8R0J7	Vacuolar protein sorting-associated protein 37B
104	Q8VDF3	Death-associated protein kinase 2
105	P02104	Hemoglobin subunit epsilon-Y2
106	Q80ZA4	Fibrocystin-L
107	Q8BH00	Aldehyde dehydrogenase family 8 member A1
108	Q8CI19	Platelet-derived growth factor C
109	O35103	Osteomodulin
110	P16301	Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase
111	P46412	Glutathione peroxidase 3
112	P49182	Heparin cofactor 2
113	P56400	Platelet glycoprotein Ib beta chain
114	Q5SVL6	Rap1 GTPase-activating protein 2
115	Q61982	Neurogenic locus notch homolog protein 3
116	Q6NVD0	FRAS1-related extracellular matrix protein 2
117	Q8BHJ6	Serine incorporator 5
118	Q8BK62	Olfactomedin-like protein 3
119	Q8K0E8	Fibrinogen beta chain
120	Q8R555	Cartilage acidic protein 1
121	Q8VC12	Urocanate hydratase
122	Q91X88	Protein O-linked-mannose beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase 1
123	A2A8L5	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase F
124	Q07235	Glia-derived nexin
125	Q8R0W0	Epiplakin
126	Q91X83	S-adenosylmethionine synthase isoform type-1
127	Q99MQ4	Asporin
128	P97321	Prolyl endopeptidase FAP
129	Q61470	Leukocyte antigen CD37
130	P42230	Signal transducer and activator of transcription 5A
131	P21836	Acetylcholinesterase
132	P28665	Murinoglobulin-1
133	P32037	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 3
134	P70389	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit
135	Q91XD4	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase

8.2. Rozwinięcia skrótów w opisach do Rycin

Rozwinięcie skrótów białek przedstawionych na interaktomie na Rycinie 23 (Sieć interakcji pomiędzy białkami zaangażowanymi w adhezję komórek zidentyfikowanymi w MSC-EVs).

Białka wymienione na interaktomie:

Ache – acetylocholinesteraza (ang. *acetylcholinesterase*)

Actg1 – aktyna, γ , cytoplazmatyczna 1 (ang. *actin, γ , cytoplasmic 1*)

CD9 – antygen CD9 (ang. *CD9 antigen*)
CD44 – receptor dla kwasu hialuronowego (ang. *receptor for hyaluronic acid*)
CD63 – antygen CD63 (ang. *CD63 antigen*)
Csrp1 – białko wzbogacone w cysteinę oraz glicynę 1 (ang. *cysteine and glycine-rich protein 1*)
Ctgf – czynnik wzrostu tkanki łącznej (ang. *connective tissue growth factor*)
Ctnd1 – katenina – białko związane z kadheryną, $\delta 1$ (ang. *catenin - cadherin associated protein, $\delta 1$*)
Emb – embigina (ang. *embigin*)
Fbn1 – fibrylina 1 (ang. *fibrillin 1*)
Fermt3 – homolog 3 białek z rodziny fermitin (ang. *fermitin family homolog 3*)
Fga – fibrynogen łańcuch α (ang. *fibrinogen α chain*)
Fgb – fibrynogen łańcuch β (ang. *fibrinogen β chain*)
Fgg – fibrynogen łańcuch γ (ang. *fibrinogen γ chain*)
Filip1 – białko oddziałujące z filaminą A (ang. *filamin A interacting protein 1*)
Fn1 – fibronektyna 1 (ang. *fibronectin 1*)
Ilkap – fosfataza serynowo/ treoninowa 2C związana z integrzynami (ang. *integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C*)
Itgal – integryna αL (ang. *integrin αL*)
Itgam – integryna αM (ang. *integrin αM*)
Itga2b – integryna $\alpha 2b$ (ang. *integrin $\alpha 2b$*)
Itga4 – integryna $\alpha 4$ (ang. *integrin $\alpha 4$*)
Itga5 – integryna $\alpha 5$ (ang. *integrin $\alpha 5$*)
Itgav – integryna αV (ang. *integrin αV*)
Itga6 – integryna $\alpha 6$ (ang. *integrin $\alpha 6$*)
Itga11 – integryna $\alpha 11$ (ang. *integrin $\alpha 11$*)
Itgb1 – integryna $\beta 1$, receptor β dla fibronektyny (ang. *integrin beta 1, fibronectin receptor β*)
Msn – miozyna (ang. *moesin*)
My12b – miozyna łańcuch lekki 12B, regulatorowy (ang. *myosin light chain 12B, regulatory*)
Neol – neogenina (ang. *neogenin*)
Ncam1 – cząsteczka adhezyjna komórek nerwowych 1 (ang. *neural cell adhesion molecule 1*)
Omd – osteomodulina (ang. *osteomodulin*)
Pdlim1 – domena 1 PDZ and LIM - elfina (ang. *PDZ and LIM domain 1 - elfin*)
Postn – periostyna, specyficzny czynnik osteoblastów (ang. *periostin, osteoblast specific factor*)
Ptk2b – białkowa kinaza tyrozynowa PTK2 β (ang. *PTK2 protein tyrosine kinase 2 beta*)
Reln – reelina (ang. *reelin*)
Siglec 1 – lektyna Ig- podobna wiążąca kwas sialowy 1, tzw. sialoadhezyjna (ang. *sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin*)
Tinagl1 – antygen 1 rurkowo-śródmiąższowego zapalenia nerek (ang. *tubulointerstitial nephritis antigen-like 1*)
Tnc – tenascyna C (ang. *tenascin C*)
Vcl – winkulina (ang. *vinculin*)

Rozwinięcie skrótów białek przedstawionych na interaktomie na Rycinie 24
 (Sieć interakcji pomiędzy białkami zaangażowanymi w adhezję komórek, rozwój naczyń krwionośnych oraz gojenie się ran zidentyfikowanymi w MSC-EVs).

Białka wymienione na interaktomie:

Ache – acetylocholinesteraza (ang. *acetylcholinesterase*)
Actg1 – aktyna, γ , cytoplazmatyczna 1 (ang. *actin, γ , cytoplasmic 1*)

Anxa1 – aneksyna A1 (ang. *annexin A1*)

Anxa2 – aneksyna A2 (ang. *annexin A2*)

Anxa5 – aneksyna A5 (ang. *annexin A5*)

Ap2b1 – zależny od adaptera kompleks białek 2, podjednostka $\beta 1$ (ang. *adaptor-related protein complex 2, $\beta 1$ subunit*)

Ap3b1 – zależny od adaptera kompleks białek 3, podjednostka $\beta 1$ (ang. *adaptor-related protein complex 3, $\beta 1$ subunit*)

Atp5b – syntaza ATP, complex mitochondrialny F1 transportujący H^+ , podjednostka β (ang. *ATP synthase, H^+ transporting mitochondrial F1 complex, β subunit*)

Cd9 – antygen CD9 (ang. *CD9 antigen*)

CD44 – receptor dla kwasu hialuronowego (ang. *receptor for hyaluronic acid*)

CD63 – antygen CD63 (ang. *CD63 antigen*)

Cpb2 – karboksypeptydaza B2 (ang. *carboxypeptidase B2*)

Cspg4 – proteoglikan siarczanu chondroityny 4 (ang. *chondroitin sulfate proteoglycan 4*)

Csrp1 – białko wzbogacone w cysteinę oraz glicynę 1 (ang. *cysteine and glycine-rich protein 1*)

Ctnd1 – katenina – białko związane z kadheryną, $\delta 1$ (ang. *catenin - cadherin associated protein, $\delta 1$*)

Ctgf – czynnik wzrostu tkanki łącznej (ang. *connective tissue growth factor*)

Ecm1 – białko macierzy zewnątrzkomórkowej 1 (ang. *extracellular matrix protein 1*)

Emb – embigina (ang. *embigin*)

ENSMUSG00000094526 – homolog oksydazy lizylowej (ang. *lysyl oxidase homolog 2*)

Entpd1 – Difosfohydrolaza trifosforanu ektonukleozydu 1 (ang. *ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1*)

Fbn1 – fibrylina (ang. *fibrillin 1*)

Fermt3 – homolog 3 rodziny białek *fermitin* (ang. *fermitin family homolog 3*)

Fga – fibrynogen łańcuch α (ang. *fibrinogen α chain*)

Fgb – fibrynogen łańcuch β (ang. *fibrinogen beta chain*)

Fgg – fibrynogen łańcuch γ (ang. *fibrinogen γ chain*)

Fn1 – fibronektyna 1 (ang. *fibronectin 1*)

F5 – czynnik krzepnięcia V (ang. *coagulation factor V*)

F10 – czynnik krzepnięcia X (ang. *coagulation factor X*)

Gpx1 – peroksydaza glutationowa 1 (ang. *glutathione peroxidase 1*)

Ilkap – fosfataza serynowo/ treoninowa 2C związana z integrzynami (ang. *integrin-linked kinase-associated serine/threonine phosphatase 2C*)

Itgal – integryna αL (ang. *integrin αL*)

Itgam – integryna αM (ang. *integrin αM*)

Itga2b – integryna $\alpha 2b$ (ang. *integrin $\alpha 2b$*)

Itga4 – integryna $\alpha 4$ (ang. *integrin $\alpha 4$*)

Itga5 – integryna $\alpha 5$ (ang. *integrin $\alpha 5$*)

Itga6 – integryna $\alpha 6$ (ang. *integrin $\alpha 6$*)

Itga11 – integryna $\alpha 11$ (ang. *integrin $\alpha 11$*)

Itgb1 – integryna $\beta 1$, receptor β dla fibronektyny (ang. *integrin $\beta 1$, fibronectin receptor β*)

Mapk1 – kinaza białkowa aktywowana mitogenem Mapk1 (ang. *mitogen-activated protein kinase 1*)

Map2k1 – kinaza białkowa aktywowana mitogenem Map2k1 (ang. *mitogen-activated protein kinase kinase 1*)

Mapk14 – kinaza białkowa aktywowana mitogenem MAPK14 (ang. *mitogen-activated protein kinase 14*)

Msn – miozyna (ang. *moesin*)

My112b – miozyna łańcuch lekki 12B, regulatorowy (ang. *myosin light chain 12B, regulatory*)
Ncam1 – cząsteczka adhezyjna komórek nerwowych 1 (ang. *neural cell adhesion molecule 1*)
Ncl – nukleolina (ang. *nucleolin*)
Neo1 – neogenina (ang. *neogenin*)
Nrp2 – neurofilina 2 (ang. *neuropilin 2*)
Omd – osteomodulina (ang. *osteomodulin*)
Pdcd6 – receptor programowanej śmierci komórek 6 (ang. *programmed cell death 6*)
Pdlim1 – domena 1 PDZ and LIM - elfina (ang. *PDZ and LIM domain 1 - elfin*)
Plek – plekstryna (ang. *pleckstrin*)
Postn – periostyna, specyficzny czynnik osteoblastów (ang. *periostin, osteoblast specific factor*)
Ptk2b – białkowa kinaza tyrozynowa PTK2 β (ang. *PTK2 protein tyrosine kinase 2 β*)
Reln – reelina (ang. *reelin*)
Rpsa – białko rybosomalne SA (ang. *ribosomal protein SA*)
Siglec 1 – lektyna Ig- podobna wiążąca kwas sialowy 1, tzw. sialoadhezyjna (ang. *sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin*)
Tinagl1 – antygen 1 rurkowo-śródmiąższowego zapalenia nerek (ang. *tubulointerstitial nephritis antigen-like 1*)
Tnc – tenascyna C (ang. *tenascin C*)
Vcl – winkulina (ang. *vinculin*)