Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Elżbieta Karnas

Wpływ pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych na potencjał hematopoetyczny krwiotwórczych komórek macierzystych krwi pępowinowej

Rozprawa doktorska

Praca doktorska została wykonana pod kierunkiem Promotora
dr hab. Ewy Zuby-Surmy, prof. UJ
w Zakładzie Biologii Komórki na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kraków 2019

Składam serdeczne podziękowania:

Pani dr hab. Ewie Zubie-Surmie, prof. UJ
Promotorowi mojej pracy, za umożliwienie mi rozwoju naukowego oraz zawodowego, przekazaną mi wiedzę oraz praktyczne umiejętności, za cenne wskazówki, a także za wieloletnią opiekę oraz wszelką okazaną mi życzliwość;

dr n. med. Małgorzacie Sekule-Stryjewskiej
oraz ***mgr Katarzynie Kmiotek-Wasylewskiej***
za pomoc w realizacji doświadczeń, a także życzliwość i wsparcie;

dr Damianowi Ryszawemu*- za pomoc w analizach mikroskopowych;*

Koleżankom i Kolegom z Zakładu Biologii Komórki WBBiB UJ
za wsparcie merytoryczne, przyjazną atmosferę oraz owocną współpracę.

Dziękuję także mojej kochanej **Rodzinie** *oraz* ***Przyjaciołom****, za nieustające wsparcie i wiarę we mnie każdego dnia.*

Elżbieta Karnas

Dorobek publikacyjny Doktorantki

1. Piska K, Koczurkiewicz P, Wnuk D, **Karnas E**, Bucki A, Wójcik-Pszczoła K, Jamrozik M, Michalik M, Kołaczkowski M, Pękala E. *Synergistic anticancer activity of doxorubicin and piperlongumine on DU-145 prostate cancer cells - The involvement of carbonyl reductase 1 inhibition*. Chem Biol Interact. 2019 Feb 25;300:40-48.

2. Czamara K, **Karnas E**, Majka Z, Wojcik T, Zuba-Surma EK, Baranska M, Kaczor A. *Impact of cell cycle dynamics on pathology recognition: Raman imaging study*. J Biophotonics. 2019 Feb;12(2):e201800152. doi: 10.1002/jbio.201800152. Epub 2018 Oct 25.

3. Adamiak M, Cheng G, Bobis-Wozowicz S, Zhao L, Kedracka-Krok S, Samanta A, **Karnas E**, Xuan YT, Skupien-Rabian B, Chen X, Jankowska U, Girgis M, Sekula M, Davani A, Lasota S, Vincent RJ, Sarna M, Newell KL, Wang OL, Dudley N, Madeja Z, Dawn B, Zuba-Surma EK, *Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Extracellular Vesicles Are Safer and More Effective for Cardiac Repair Than iPS*, Circ Res. 2018, 122(2):296-309.

4. Dabrowska S, Del Fattore A, **Karnas E**, Frontczak-Baniewicz M, Kozlowska H, Muraca M, Janowski M, Lukomska B, *Imaging of extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells using fluorescent and magnetic labels*. Int J Nanomedicine 2018, 13:1653-1664.

5. Sekuła M, Domalik-Pyzik P, Morawska-Chochół A, Bobis-Wozowicz S, **Karnas E**, Noga S, Boruczkowski D, Adamiak M, Madeja Z, Chłopek J, Zuba-Surma EK., *Polylactide- and polycaprolactone-based substrates enhance angiogenic potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in vitro - implications for cardiovascular repair*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2017 77:521-533.

6. Galanty A, Koczurkiewicz P, Wnuk D, Paw M, **Karnas E**, Podolak I, Węgrzyn M, Borusiewicz M, Madeja Z, Czyż J, Michalik M, *Usnic acid and atranorin exert selective cytostatic and anti-invasive effects on human prostate and melanoma cancer cells*, Toxicol In Vitro. 2017 Apr;40:161-169.

7. Zimolag E, Borowczyk-Michalowska J, Kedracka-Krok S, Skupien-Rabian B, **Karnas E**, Lasota S, Sroka J, Drukala J, Madeja Z, *Electric field as a potential directional cue in homing of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to cutaneous wounds*, Biochim Biophys Acta. 2017 Feb;1864(2):267-279.

8. Bobis-Wozowicz S, Kmiotek K; Kania K, **Karnas E**, Labedz-Maslowska A; Sekula M, Kedracka-Krok S, Kolcz J; Boruczkowski D, Madeja Z, Zuba-Surma E, *Diverse*

impact of xeno-free conditions on biological and regenerative properties of hUC-MSCs and their extracellular vesicles, J Mol Med, 2017 Feb;95(2):205-220.

9. Łabędź-Masłowska A, **Kamycka E**, Bobis-Wozowicz S, Madeja Z and 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.

10. Faryan M, **Kamycka E**, Mizia-Stec K, Wojakowski W, Wybraniec M, Hoffmann A, Nowak S, Kolasa J, Zuba-Surma E, Wnuk-Wojnar AM, *Mobilization of stem and progenitor cells in patients with atrial fibrillation undergoing circumferential pulmonary vein isolation.* Int J Cardiol. 2016 Jan 15;203:415-7.

11. Łabędz-Masłowska A, Lipert B, Berdecka D, Kedracka-Krok S, Jankowska U, **Kamycka E**, Sekula M, Madeja Z, Dawn B, Jura J and 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).

12. Durbas M, Horwacik I, Boratyn E, **Kamycka E** and Rokita H, *GD2 ganglioside specific antibody treatment downregulates PI3K/Akt/mTOR signaling network in human neuroblastoma cell lines*. Int J Oncol. 2015 Sep;47(3)

13. Bobis-Wozowicz S, Kmiotek K, Sekuła M, Kędracka-Krok S, **Kamycka E**, Jankowska U, Madetko-Talowska A, Bik-Multanowski M, Drabik G, Kołcz J, Boruczkowski J, Madeja Z and Zuba-Surma EK, *Human induced pluripotent stem cell-derived microvesicles transmit RNAs and proteins to recipient mature heart cells modulating cell fate and behavior.* Stem Cells. 2015 Sep;33(9).

14. Borówka M, Styczuła W, **Kamycka E**, Madeja Z, Zuba-Surma E, Skalski J, Kołcz J, *Mobilization of stem cells into the peripheral blood in children with congenital heart disease*. Kardiochirurgia i Torakochirurgia Polska 2013; 10 (4): 403-409.

15. Zuba-Surma E, Łabędź-Masłowska A, **Kamycka E**, Madeja Z, Ratajczak MZ, *Wieloparametrowa klasyczna i obrazowa cytometria przepływowa w identyfikacji komórek macierzystych.* Cytometria Polska 2012; 1 (1).

Wykonane w niniejszej pracy eksperymenty finansowane były w ramach następujących Projektów kierowanych przez dr. hab. Ewę Zubę-Surmę, prof. UJ:

1. TEAM/2012-9/6 pt. *„Bioaktywne mikrofragmenty z komórek macierzystych, jako nowe narzędzie w regeneracji tkanek”*, przyznany przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej;

2. POIG 01-01-02-00-109/09 pt. *„Innowacyjne metody wykorzystania komórek macierzystych w medycynie”,* przyznany przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju;

3. Symfonia 3 UMO-2015/16/W/NZ4/00071 pt. „*Optymalizacja złożonych biokompatybilnych rusztowań opartych o grafen oraz zdefiniowane populacje komórek macierzystych dla celów regeneracji tkanek”,* przyznany przez Narodowe Centrum Nauki.

Część badań finansowana była także z Grantu dla Młodych Naukowców BMN 19/2016 pt. „*Zbadanie wpływu i mechanizmu działania mikropęcherzyków z komórek hiPS na aktywność chemotaktyczną komórek macierzystych hematopoetycznych krwi pępowinowej”*, przyznanego Doktorantce przez Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego posiada status Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) wspieranego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE **8**

SUMMARY **10**

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW **12**

1. WSTĘP **14**

1.1. Hematopoetyczne komórki macierzyste 14
1.1.1. Definicja oraz klasyfikacja komórek macierzystych 14
1.1.2. Hematopoetyczne komórki macierzyste - rys historyczny oraz charakterystyka ogólna 15
1.1.3. Nisza komórek hematopoetycznych 17
1.1.4. Proces hematopoezy i hierarchia komórek krwiotwórczych 21
1.1.5. Regulacja puli komórek HSCs w organizmie 23
1.1.5. Metody oceny właściwości biologicznych i funkcjonalnych komórek HSCs 25
1.2. Wykorzystanie krwi pępowinowej jako źródła HSCs w medycynie transplantacyjnej 28
1.2.1. Krew pępowinowa jako bogate źródło komórek macierzystych 28
1.2.2. Zastosowanie krwi pępowinowej jako materiału przeszczepowego w praktyce klinicznej 30
1.2.3. Zalety oraz ograniczenia wykorzystania krwi pępowionowej w praktyce klinicznej 32
1.2.4. Strategie zwiększenia efektywności terapeutycznej komórek HSCs z krwi pępowinowej 33
1.3. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe jako nowe narzędzie w naukach biomedycznych 38
1.3.1. Definicja i klasyfikacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych 38
1.3.2. Zawartość molekularna EVs 40
1.3.3. Biogeneza i mechanizm wydzielania EVs 42
1.3.4. Metody izolacji EVs 42
1.3.5. EVs jako parakrynne czynniki wymiany informacji 43
1.3.6. Możliwości zastosowania EVs w naukach biomedycznych 46

2. CELE PRACY **49**

3. MATERIAŁY I METODY **51**

3.1. Użyte programy komputerowe 51
3.2. Metody 52
3.2.1. Izolacja komórek $CD34^+$ z KP 52
3.2.2. Hodowle komórkowe 55
3.2.3. Izolacja hiPS-EVs 57
3.2.4. Charakterystyka ilościowa i jakościowa próbek zawierających hiPS-EVs 58
3.2.5. Inkubacja komórek $CD34^+$ z hiPS-EVs 63
3.2.6. Wizualizacja wnikania hiPS-EVs do komórek $CD34^+$ *in vitro* 65
3.2.7. Analiza tempa ekspansji *ex vivo* komórek $CD34^+$ z KP 66
3.2.8. Analiza aktywności metabolicznej komórek $CD34^+$ 66
3.2.9. Fenotypowanie komórek $CD34^+$ w trakcie ekspansji *ex vivo* 67
3.2.10. Test potencjału klonogennego komórek $CD34^+$ 67
3.2.11. Test apoptozy indukowanej staurosporyną 69

3.2.12. Test chemotaksji komórek $CD34^+$ w gradiencie SDF-1 69
3.2.13. Analiza zmian wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia w komórkach $CD34^+$ stymulowanych chemoatraktantem 71
3.2.14. Test adhezji komórek $CD34^+$ do fibronektyny *in vitro* 72
3.2.15. Test oceniający adhezję komórek $CD34^+$ do komórek mezenchymalnych oraz komórek śródbłonka naczyniowego *in vitro* 72
3.2.16. Analiza zmian ekspresji genów w komórkach $CD34^+$ poddanych ekspansji *ex vivo* 73
3.2.17. Analiza zmian fosforylacji kinaz białkowych w komórkach $CD34^+$ 79
3.2.18. Analiza zasiedlania nisz hematopoetycznych oraz chimeryzmu *in vivo* po przeszczepie komórek $CD34^+$ z KP 83
3.2.19. Analiza statystyczna danych 86

4. WYNIKI 87

4.1. Analiza morfologii oraz fenotypu hiPS-EVs 87
4.2. Izolacja oraz hodowla frakcji komórek z KP wzbogaconej w HSCs *in vitro* 93
4.3. Ocena internalizacji hiPS-EVs przez komórki $CD34^+$ *in vitro* 95
4.4. Analiza wpływu hiPS-EVs na tempo ekspansji komórek HSCs z KP *in vitro* 97
4.5. Ocena wpływu hiPS-EVs na aktywność metaboliczną komórek HSCs z KP *in vitro* 98
4.6. Ocena wpływu ekspansji komórek krwiotwórczych z KP z hiPS-EVs na ich różnicowanie w kierunku linii hematopoetycznych *in vitro* 99
4.7. Ocena wpływu hiPS-EVs na ukierunkowany potencjał klonogenny komórek HSCs z KP *in vitro* 102
4.8. Analiza aktywności cytoprotekcyjnej hiPS-EVs wobec komórek $CD34^+$ poddanych działaniu czynnika toksycznego *in vitro* 105
4.9. Ocena aktywności chemotaktycznej *in vitro* komórek krwiotwórczych z KP po kontakcie z hiPS-EVs 106
4.10. Analiza wpływu hiPS-EVs na adhezję komórek $CD34^+$ *in vitro* 110
4.11. Ocena ekspresji genów związanych z hematopoezą w komórkach $CD34^+$ z KP poddanych działaniu hiPS-EVs *in vitro* 113
4.12. Analiza wpływu hiPS-EVs na aktywność wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowania w komórkach $CD34^+$ izolowanych z KP 122
4.13. Ocena wpływu hiPS-EVs na zasiedlanie nisz szpikowych i rekonstytucję układu krwiotwórczego przez komórki $CD34^+$ z KP *in vivo* 131

5. DYSKUSJA 135

6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI KOŃCOWE 156

7. SPIS PIŚMIENNICTWA 158

STRESZCZENIE

Krew pępowinowa (KP), jako bogate źródło komórek macierzystych (KM) – w szczególności KM krwiotwórczych (ang. *hematopoietic stem cells*; HSCs), stanowi obiecującą alternatywę dla przeszczepów szpiku kostnego u pacjentów z koniecznością rekonstytucji układu krwiotwórczego. Jej wykorzystanie w hematologii transplantacyjnej niesie ze sobą dodatkowe korzyści wynikające z nieinwazyjnego pobrania, mniej restrykcyjnych wymagań dopasowania antygenów zgodności tkankowej, a także zmniejszonego ryzyka wystąpienia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi.

Z drugiej jednak strony, zastosowanie KP u dorosłych pacjentów wiąże się z ryzykiem opóźnionego wszczepienia u biorcy, będącego efektem niedostatecznej liczby podanych komórek HSCs obecnych w materiale, limitowanej objętością pobranej podczas porodu KP. Stąd też, skuteczne wykorzystanie preparatów KP w transplantologii, w tym u osób dorosłych, wciąż wymaga poszukiwania nowych strategii ekspansji komórek HSCs *ex vivo*, z jednoczesnym zwiększeniem ich potencjału hematopoetycznego i efektywności zasiedlania nisz szpikowych po przeszczepie.

Z badań przeprowadzonych dotychczas w naszym zespole wynika, że zastosowanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (ang. *extracellular vesicles*; EVs) – obłonionych struktur o średnicy od 30 nm do 1 µm, wydzielanych przez indukowane komórki macierzyste pluripotencjalne (ang. *human induced pluripotent stem cells*; hiPS) może zwiększać proliferację i modulować szereg funkcji innych komórek. EVs zawierają aktywne biologicznie molekuły, w tym receptory, białka cytoplazmatyczne, czynniki transkrypcyjne oraz kwasy nukleinowe (w szczególności mRNA oraz miRNA), które mogą być przenoszone pomiędzy komórkami, stanowiąc istotne parakrynne czynniki wymiany informacji. Stąd też, sukcesywnie wzrasta zainteresowanie badaczy próbami zastosowania EVs do modyfikacji funkcji biologicznych komórek docelowych.

Dotychczasowe, nieliczne badania nad zastosowaniem EVs w modulacji potencjału regeneracyjnego komórek HSCs z KP koncentrują się głównie na pęcherzykach wydzielanych przez komórki stromalne niszy, a wciąż niewiele wiadomo na temat wpływu EVs pochodzących z innych typów KM na właściwości biologiczne komórek krwiotwórczych. W kontekście tych prac, interesującym było zbadanie czy EVs z komórek hiPS (hiPS-EVs) będą także wykazywać funkcjonalny efekt na komórki krwiotwórcze z KP, w kontekście możliwości ich potencjalnego zastosowania w hematologii transplantacyjnej.

W związku z powyższym, celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie wpływu hiPS-EVs na właściwości biologiczne i potencjał hematopoetyczny komórek HSCs z KP, zarówno w warunkach *in vitro,* jak i *in vivo* w modelu rekonstytucji szpikowej u myszy szczepu NOD/SCID.

Przeprowadzone badania wykazały m.in., że hiPS-EVs mogą skutecznie oddziaływać z wysokooczyszczonymi frakcjami komórek KP, wzbogaconymi w HSCs i poddanymi ekspansji *ex vivo*. Pomimo braku znaczącego wpływu na tempo

proliferacji, stymulacja za pomocą hiPS-EVs zwiększała aktywność metaboliczną komórek HSCs oraz ich różnicowanie w kierunku poszczególnych linii komórek hematopoetycznych *in vitro*. Wykazano również, że potencjał klonogenny komórek HSCs z KP ulega zwiększeniu po kontakcie z hiPS-EVs *in vitro*, a wyniki te korelowały ze wzrostem ekspresji genów związanych z hematopoezą w tych komórkach. Ponadto, przeprowadzone doświadczenia wskazują, że hiPS-EVs wykazują właściwości cytoprotekcyjne wobec komórek HSCs poddanych działaniu czynników cytotoksycznych. Dalsze analizy wykazały także wzrost właściwości adhezyjnych komórek HSCs oraz ich chemotaktycznej migracji *in vitro,* poddanych działaniu czynników obecnych w hiPS-EVs. W komórkach HSCs poddanych działaniu hiPS-EVs, zaobserwowano też istotne zmiany aktywności szeregu kinaz białkowych zaangażowanych w ważne szlaki sygnałowe, uczestniczące w regulacji wymienionych procesów. Uzyskane wyniki badań *in vitro* świadczą o zwiększeniu aktywności biologicznej oraz potencjału hematopoetycznego komórek HSCs z KP w wyniku działania bioaktywnej zawartości hiPS-EVs.

Wyniki badań *in vivo* potwierdzają obserwacje uzyskane w badaniach *in vitro*. W szczególności, wykazano pozytywny wpływ hiPS-EVs na zdolność komórek HSCs z KP do zasiedlania nisz szpikowych i rekonstytucji układu krwiotwórczego u myszy NOD/SCID, poddanych uprzednio radiacyjnej mieloablacji.

Podsumowując, w niniejszej rozprawie doktorskiej po raz pierwszy wykazano, że hiPS-EVs mogą modulować aktywność biologiczną komórek HSCs izolowanych z KP, a tym samym wpływać na ich cechy funkcjonalne istotne z punktu widzenia zastosowania tych komórek w hematologii transplantacyjnej. Otrzymane rezultaty badań stanowią podstawę do dalszych prac badawczych nad próbą zastosowania hiPS-EVs do zwiększenia potencjału regeneracyjnego tych komórek, a tym samym potencjalnego poszerzenia możliwości zastosowania KP w praktyce klinicznej.

SUMMARY

Umbilical cord blood (CB) as a rich source of stem cells (SCs), especially hematopoietic stem cells (HSCs), is a promising material alternative for bone marrow transplantation in patients requiring the hematopoietic system reconstitution. Its utilization in the hematology provides additional benefits resulting from non-invasive collection, less stringent requirements for the donor matching as well as a reduced risk of graft-versus host disease. On the other hand, the use of CB cells in adult patients is associated with the risk of delayed engraftment resulting from the insufficient number of HSCs present in the transplanted material, which may be limited by the volume of CB unit collected during the delivery. Therefore, effective utilization of CB in the transplantology still requires the development of novel strategies of HSCs expansion *ex vivo*, with simultaneous increase in their hematopoietic potential and efficiency to engraft into the bone marrow niches after the transplantation.

So far, the research conducted in our laboratory have shown that the use of extracellular vesicles (EVs) – vesicular structures with a diameter ranging from 30 nm to 1 μm, secreted by human induced pluripotent stem cells (hiPS) - can increase proliferation and modulate several functions of target cells. EVs are known to contain biologically active molecules including receptors, cytoplasmic proteins, transcription factors and nucleic acids (in particular mRNA and miRNA) that can be transferred between the cells mediating the exchange of biological information *via* transferring several paracrine factors. Hence, the scientific interest attempting the use of EVs to modify the biological functions of target cells is gradually increasing.

Currently, few studies conducted on the use of EVs in modulation of the regenerative potential of CB-derived HSCs are mainly focused on vesicles secreted by stromal cells. Importantly, still little is known about the impact of EVs from other SCs types on the biological properties of hematopoietic cells. Thus, it was interesting to investigate whether EVs from hiPS cells (hiPS-EVs) will also possess a functional effect on CB-derived HSCs, in the context of their potential use in the hematology.
Therefore, the aim of this study was to investigate the effect of hiPS-EVs on biological properties and hematopoietic potential of HSCs isolated from CB, both *in vitro* as well as *in vivo*, in the murine model of bone marrow reconstitution after mieloablative irradiation.

The results obtained in this study showed that hiPS-EVs can effectively interact with highly purified CB-derived $CD34^+$ fraction enriched in HSCs, subjected to *ex vivo* expansion. Despite the lack of a significant effect on the proliferation rate, the stimulation with hiPS-EVs significantly increased the metabolic activity of HSCs and their capacity to differentiate toward hematopoietic lineages *in vitro*. It was also shown that the clonogenic potential of CB-derived HSCs was enhanced after the contact with hiPS-EVs *in vitro*, and these results correlated with the increase in the expression of hematopoietic genes in those cells. In addition, performed experiments revealed that hiPS-EVs have a great cytoprotective effect on HSCs exposed to cytotoxic agents. Further analyzes have also shown an increase in the adhesion efficacy and chemotactic

migration of CB-HSCs *in vitro* following the treatement with factors present in hiPS-EVs. Additionally, we also observed significant changes in the activity of a number of protein kinases involved in important signaling pathways in HSCs cells after the treatment with hiPS-EVs. Thus, obtained results of *in vitro* studies indicated that bioactive content of hiPS-EVs increased biological activity and hematopoietic potential of CB-derived HSCs.

In next step, I also performed *in vivo* study supporting the results obtained from experiments conducted *in vitro*. In particular, it has been demonstrated that hiPS-EVs may have the positive effect on the ability of HSCs isolated from CB to home and engraft to bone marrow niches, as well as on the effectiveness of reconstitution of the hematopoietic system after the myeloablation in NOD/SCID mice.

In conclusion, for the first time we demonstrated that hiPS-EVs can modulate the biological activity of CB-derived HSCs impacting on their functional properties important for their use in hematology. Our results constitute important basis for further research on potential employment of hiPS-EVs as effective agents increasing the regenerative potential of hematopoietic cells and in consequence enhancing the possibility for clinical applications of CB samples.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

7-AAD - barwnik jądrowy 7-aminoaktynomycyna D (ang. *7-aminoactinomycin D*)
AFM - mikroskopia sił atomowych (ang. *atomic force microscopy*)
APC - allofikocyjanina (ang. *allophycocyanin*)
ATP - adenozynotrifosforan (ang. *adenosine triphosphate*)
BFU-E - hematopoetyczne kolonie erytroidalne (ang. *burst forming unit-erythroid*)
BSA - surowicza albumina wołowa (ang. *bovine serum albumin*)
CFC - test tworzenia kolonii (ang. *colony-forming cell assay*)
CFU-E - jednostka tworzenia kolonii (ang. *colony-forming unit-erythroid*)
copGFP - wariant białka zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescence protein*; GFP) wyizolowane po raz pierwszy z widłonoga (ang. *copepepod*) *Pontellina plumata*
ECM - macierz zewnątrzkomórkowa (ang. *extracellular matrix*)
EVs - pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. *extracellular vesicles*)
ESCRT - endosomalny kompleks sortujący odpowiedzialny za transport (ang. *endosomal sorting complex responsible for transport*)
FACS - aktywowane fluorescencyjnie sortowanie komórek (ang. *fluorescence-activated cell sorting*)
FBS - płodowa surowica bydlęca (ang. *fetal bovine serum*)
FITC - izotiocyjanian fluoresceiny (ang. *fluorescein-5-isothiocyanate*)
FLT3L - ligand FMS-podobnej kinazy tyrozynowej 3 (ang. *FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*)
G-CSF - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (ang. *granulocyte colony-stimulating factor*)
GM-CSF - czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytarno-makrofagowych (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)
GEMM - hematopoetyczne kolonie mieszane (ang. *colony forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte*)
GM - hematopoetyczne kolonie granulocytarno-makrofagowe (ang. *colony forming unit-granulocyte- macrophage*)
GvHD - choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (ang. *graft-versus host disease*)
HLA - ludzki antygen leukocytarny, zwany też antygenem zgodności tkankowej (ang. *human leukocyte antigen)*
HRP - peroksydaza chrzanowa (ang. *horseradish peroxidase*)
HSCs - komórki macierzyste hematopoetyczne (ang. *hematopoietic stem cells)*
HUVECs - komórki śródbłonka żyły pępowinowej (ang. *human umbilical vein endothelial cells*)
ICAM-1 - cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1 (ang. *intercellular adhesion molecule 1*)
iPS - indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. *induced pluripotent stem cells*)
KM - komórki macierzyste (ang. *stem cells)*
KP - krew pępowinowa (ang. *cord blood)*

LFA-1 - antygen związany z funkcją limfocytów 1 (ang. *lymphocyte function associated antigen 1)*
Lin - skrót od angielskiego słowa *lineage* – odnoszący się do antygenów tzw. liniowych, obecnych na dojrzałych komórkach krwi
LT-HSCs - komórki HSCs zapewniające długotrwałą odnowę szpikową (ang. *long-term HSCs*)
MACS - aktywowane magnetycznie sortowanie komórek (ang. *magnetic-activated cell sorting*)
MHC - główny układ zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*)
MKO - mobilizowana krew obwodowa (ang. *mobilized peripheral blood)*
MVBs - ciałka wielopęcherzykowe (ang. *multivesicular bodies*)
MSCs - mezenchymalne komórki stromy (ang. *mesenchymal stem/stromal cells*)
NTA - analiza śledzenia ruchów Browana nanocząstek (ang. *nanoparticle tracking analysi*s)
NOD-SCID - szczep myszy z upośledzeniem odporności (ang. *nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency disease*)
PE - fikoerytryna (ang. *phycoerythrin*)
PBS - buforowany fosforanem roztwór soli fizjologicznej (ang. *phosphate buffered saline*)
qPCR - reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative real time polymerase chain reaction)*
SCF - czynnik komórek macierzystych (ang. *stem cell factor*)
SD - odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*)
SDF-1 - czynnik pochodzenia stromalnego 1 (ang. *stromal cell- derived factor 1*)
SNARE - białko receptora SNAP (ang. *SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) Receptor*)
SzK - szpik kostny (ang. *bone marrow)*
TGF-β - transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *transforming growth factor beta*)
TP - temperatura pokojowa (ang. *room temperature*)
UC-MSCs - komórki mezenchymalne z galarety Wharton'a sznura pępowinowego (ang. *umbilical cord Wharton's jelly MSCs*)
VCAM-1- naczyniowa cząsteczka adhezyjna 1 (ang. *vascular cell adhesion molecule 1*)
VLA-4 - integryna α4, zwana też bardzo późnym antygenem 4 (ang. *very late antigen 4)*
VLA-5 - integryna α5, zwana też bardzo późnym antygenem 5 (ang. *very late antigen 5)*

1. WSTĘP

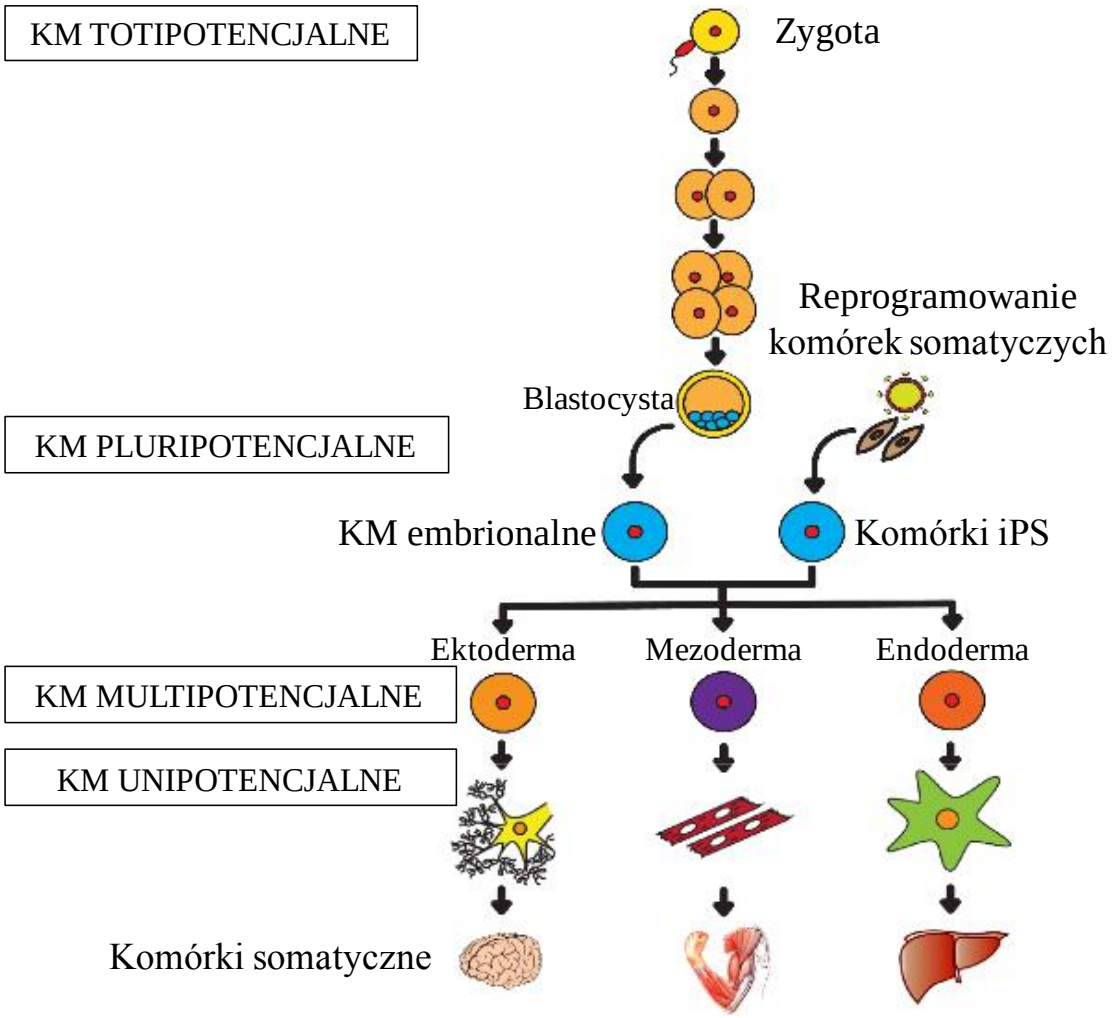
1.1. Hematopoetyczne komórki macierzyste

1.1.1. Definicja oraz klasyfikacja komórek macierzystych

Komórki macierzyste (KM) reprezentują typ komórek organizmu posiadających zdolność do teoretycznie nieograniczonych podziałów komórkowych (samoodnowy) oraz różnicowania (specyfikacji) w inne typy komórek dojrzałych (1). Jednakże, KM są heterogenną grupą różniącą się potencjałem do różnicowania, co stanowi podstawę do ich klasyfikacji (Rycina 1) (2).

Na szczycie hierarchii KM znajdują się komórki totipotencjalne, posiadające zdolność do różnicowania we wszystkie typy zarówno tkanek organizmu, jak i pozazarodkowych (łożysko). Cechy takie posiada w szczególności zygota, czyli zapłodniona komórka jajowa. W dalszym etapie rozwoju zarodkowego, w obrębie moruli oraz blastocysty pojawiają się komórki pluripotencjalne, zdolne do różnicowania we wszystkie typy tkanek z wyjątkiem łożyska. Dalej, w związku ze postępującą specyfikacją tkankową, w hierarchii KM wyróżniamy komórki multipotencjalne - wykazujące potencjał do różnicowania w różne tkanki w obrębie jednego listka zarodkowego. Do tej grupy zaliczamy m.in. mezenchymalne KM (ang. *mesenchymal stem/stromal cells;* MSCs) (3, 4), komórki satelitarne mięśni szkieletowych (5, 6), miazgi zębowej (7) oraz hematopoetyczne KM (ang. *hematopoietic stem cells*; HSCs) (8). Z kolei KM unipotencjalne, czyli progenitory, stanowią najbardziej tkankowo ukierunkowaną frakcję, zdolną do różnicowania w komórki w obrębie jednego typu tkanki (9). Przykładem są komórki obecne w nabłonku rogówki (10), komórki owalne wątroby oraz komórki progenitorowe śródbłonka (11).

Istnieją także inne typy klasyfikacji KM, oparte m.in. o ich pochodzenie, gdzie rozróżnia się m.in. KM naturalnie występujące w organizmie oraz KM generowane w laboratorium w wyniku manipulacji genetycznych. Przykładem tych drugich są **indukowane pluripotencjalne KM** (ang. *induced pluripotent stem cells*; iPS), wyprowadzone po raz pierwszy w 2006 roku przez grupę profesora Yamanaki, w wyniku reprogramowania genetycznego mysich komórek somatycznych, z wykorzystaniem wektorów kodujących czynniki transkrypcyjne związane z pluripotencją, w tym Oct-3/4, Sox-2, Klf-4 oraz c-Myc (Rycina 1) (12). Rok później w analogiczny sposób udało się mu także otrzymać linię ludzkich komórek iPS w wyniku modyfikacji fibroblastów skórnych (13). Uznaniem tych prac było przyznanie profesorowi Yamanace Nagrody Nobla w 2012 roku, a jego dokonania otworzyły nowy rozdział w dziedzinie badań nad KM oraz nad możliwościami ich zastosowania w naukach biomedycznych, co stanowi dziś mocno rozwijający się obszar badawczy na świecie.



Rycina 1. Schemat hierarchii KM. Zmodyfikowano na podstawie (14).

1.1.2. Hematopoetyczne komórki macierzyste - rys historyczny oraz charakterystyka ogólna

Komórki macierzyste krwiotwórcze, czyli hematopoetyczne (HSCs) to populacja dająca początek różnym typom komórek krwi w wieloetapowym procesie hematopoezy (15). Głównym rezerwuarem tych komórek w dorosłym organizmie człowieka jest szpik kostny (SzK), a częstotliwość ich występowania szacuje się na ok. 1 komórkę przypadającą na $1 \cdot 10^4$-$1 \cdot 10^5$ komórek jądrzastych SzK (15).

Początki historii badań nad HSCs przypadają na obserwacje Ray'a Owena z 1945 roku, w których wykazał, że wymiana krwi między bliźniętami bydląt w czasie ich życia płodowego może skutkować posiadaniem przez nie komórek o dwóch różnych grupach krwi w ciągu całego ich życia (16). Kontynuacją jego badań były prace Medewara, w których wykazał tolerancję immunologiczną wobec wstrzykiwanej krwi u płodów oraz osesków myszy (17). Rezultaty tych badań stały się podstawą do przyznania mu nagrody Nobla w 1960 roku. Następnie, pionierskie badania Tilla oraz McCulloha z 1961 roku wykazały obecność klonalnych prekursorów

hematopoetycznych w mysim szpiku kostnym oraz śledzionie, zdolnych nie tylko do różnicowania, ale i do samoodnowy (18, 19).

Początkowe badania nad komórkami HSCs, koncentrujące się na ich charakterystyce funkcjonalnej, stały się podstawą do dalszych prac nad ich identyfikacją, opartą głównie na wieloantygenowej analizie fenotypowej. **W organizmie człowieka, głównym markerem charakterystycznym dla HSCs jest antygen CD34**, początkowo nazwany My-10, który został po raz pierwszy zidentyfikowany w 1984 roku na komórkach mieloblastycznej linii KG-1a (20). Komórki posiadające jego ekspresję wykazywały wysoki potencjał do tworzenia kolonii hematopoetycznych *in vitro*. Kilka lat później wyniki te zostały potwierdzone w badaniach innych grup, dowodząc, że komórki posiadające ekspresję antygenu CD34 są zdolne do rekonstytucji szpiku u letalnie naświetlonych pawianów (21). Cząsteczka CD34 to glikofosfoproteina (sialomucyna) zlokalizowana w błonie komórkowej, o masie cząsteczkowej 105-120 kDa (22, 23). Pomimo braku szczegółowych informacji na temat funkcji tego antygenu, postuluje się, że może być on zaangażowany w transdukcję sygnału, gdyż jego wewnątrzkomórkowy łańcuch ulega fosforylacji za pomocą aktywowanej kinazy białkowej C. Jednakże sama cząsteczka CD34 nie posiada wewnętrznej aktywności kinazowej (24, 25). Ponadto, niektóre prace wskazują na udział CD34 w regulacji procesu adhezji komórek, m.in. poprzez interakcję z L-selektyną, przy czym efekt funkcjonalny jest zależny od typu komórek (26, 27). Co ważne, cząsteczka CD34 może także pośredniczyć w interakcji komórek hematopoetycznych ze stromą szpiku (28). Wykazano ponadto, że antygen ten oddziałuje z białkiem adaptorowym CrkL, pośredniczącym m.in. w przekazie sygnału od receptorów integrynowych (29). Co ciekawe, pomimo faktu, że u myszy z wyłączoną ekspresją genu dla CD34 zaobserwowano opóźnioną erytropoezę oraz mielopoezę, osobniki te rozwijały się prawidłowo, a profil komórek krwi u dorosłych zwierząt nie odbiegał od normy. Mimo to, potencjał do tworzenia kolonii przez szpikowe i śledzionowe progenitory hematopoetyczne tych myszy był znacząco zmniejszony (30).

Warto zaznaczyć, że antygen CD34 ulega ekspresji nie tylko na powierzchni HSCs oraz powstających z nich prekursorów, ale może on być także obecny na komórkach endotelialnych, mastocytach (24, 31) oraz na części komórek mieszka włosowego w fazie anagenu (32).

Dalsze prace nad izolacją i charakterystyką ludzkich HSCs pozwoliły wytypować także inne istotne markery powierzchniowe poszczególnych subpopulacji tych komórek, w tym m.in. obecność antygenu CD59 (odpowiednika mysiego antygenu komórek macierzystych; z ang. *stem cell antigen-1*; Sca-1) oraz cząsteczki KDR, będącej receptorem typu 2 dla czynnika wzrostowego śródbłonka naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor receptor 2*; VEGFR2), przy jednoczesnym zróżnicowanym poziomie ekspresji antygenów Thy-1 (CD90), c-kit (CD117) oraz CD38 (33, 34). Ponadto, inny ważny antygen - CD133, okazał się być również istotnym markerem, ulegającym ekspresji na ludzkich KM, w tym na subpopulacjach HSCs posiadających wysoki potencjał repopulacyjny (35-37). Co istotne, zidentyfikowano także rzadką populację komórek CD34-negatywnych wykazujących cechy

prymitywnych HSCs, zdolnych do odtworzenia układu krwiotwórczego w modelach zwierzęcych – w tym u myszy poddanych ablacji szpiku (38, 39) oraz u owiec (40). Wykazano ponadto, że oprócz wielokierunkowego różnicowania w elementy morfotyczne krwi, komórki $CD34^-$ mogą dawać początek komórkom $CD34^+$ (41). Posiadają one także niską aktywność tworzenia kolonii hematopoetycznych, jednak w warunkach hodowli *ex vivo* podejmują proliferację w obecności kombinacji odpowiednich czynników wzrostowych (42, 43).

Komórki HSCs, jako populacja należąca do układu hematopoetycznego, posiadają także na swojej powierzchni antygen CD45. Jest to cząsteczka obecna na wszystkich komórkach krwi (bez względu na stopień ich zróżnicowania), z wyjątkiem dojrzałych erytrocytów, stąd też określany jest on jako tzw. antygen panleukocytarny (ang. *leukocyte common antigen*; LCA) (44). Co istotne, cząsteczka CD45 posiada kilka izoform, a poziom jej ekspresji zależy od stopnia zróżnicowania komórek, przy czym dla HSCs oraz wczesnych progenitorów krwiotwórczych jest on niższy w porównaniu do dojrzałych komórek krwi, stąd też często identyfikuje się je jako $CD45^{dim}$ (45, 46).

Poza markerami powierzchniowymi, poszukuje się także innych cech charakterystycznych dla komórek HSCs, w tym w szczególności ich najbardziej prymitywnych subpopulacji. Jedną z proponowanych jest zdolność części tych komórek do aktywnego usuwania barwnika Hoechst 33342 z cytoplazmy (47, 48), za co odpowiadają białka transporterowe ABCG2 obecne w błonie komórkowej (49). Podobnie, wykazano, że wczesne rozwojowo komórki HSCs są w stanie także wypompowywać barwnik mitochondrialny rodaminę-123, dzięki obecności podobnych transporterów błonowych (50, 51).

Co ważne, przy izolacji i identyfikacji komórek HSCs, istotny jest również dobór odpowiednich markerów, które nie powinny ulegać ekspresji na powierzchni tych komórek, czyli tzw. markerów „negatywnych". Zaliczamy do nich głównie tzw. markery liniowe (Lin), czyli antygeny obecne na dojrzałych komórkach krwi poszczególnych linii hematopoetycznych, których obecności nie powinno się obserwować w przypadku wczesnych rozwojowo frakcji KM krwiotwórczych. Przykładami takich antygenów są m.in. antygen CD3 obecny na linii limfocytów T, CD19 jako marker linii limfocytów B (52), CD14 obecny na makrofagach i monocytach (53) oraz glikoforyna A (CD235a) występująca na erytrocytach (54). Odpowiednio zdefiniowany profil wieloantygenowy, obejmujący zarówno markery chrakterystyczne, obecne na powierdzchni HSCs, jak również antygeny negatywne – stanowi podstawę dla identyfikacji i izolacji oczyszczonych frakcji tych KM.

1.1.3. Nisza komórek hematopoetycznych

Niszą komórkową nazywa się bezpośrednie otoczenie komórki w jej natywnym środowisku tkankowym, na które składają się jej interakcje z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej, innymi komórkami obecnymi w niszy oraz wydzielanymi przez nie czynnikami parakrynnymi (55). Wzajemna interakcja z niszą jest kluczowym czynnikiem warunkującym funkcjonalne zachowanie komórek, mogącym kierować

je na drogę proliferacji, różnicowania lub wejścia w stan wyciszenia (ang. *quiescence*), a w niektórych przypadkach nawet sprzyjać bądź hamować procesy nowotworzenia (55).

Wieloletnie badania wskazują, że oddziaływanie niszy ma kluczowe znaczenie w determinowaniu potencjału komórek HSCs do ich samoodnowy oraz różnicowania (56, 57). Jak wspomniano, nisza komórek HSCs w dorosłym organizmie człowieka zlokalizowana jest w SzK, przy czym istnieje szereg doniesień świadczących o jej heterogenności (58, 59). Rozróżnia się nisze śródkostne (ang. *endosteal*) i naczyniowe (ang. *perivascular)*, które dalej podzielić można na tętniczkowe oraz sinusoidalne (56, 60). W poszczególnych typach nisz odnaleźć można komórki HSCs o różnym stadium aktywacji. Przykładowo, wykazano, że nieaktywne mitotycznie komórki zlokalizowane są śródkostnie oraz w okolicy tętniczek, a komórki aktywnie dzielące się znajdują się w sąsiedztwie nisz sinusoidalnych (61, 62). Zatem oddziaływanie komórek HSCs z elementami niszy ma istotne znaczenie dla ich funkcji, a co za tym idzie zachodzących procesów hematopoezy.

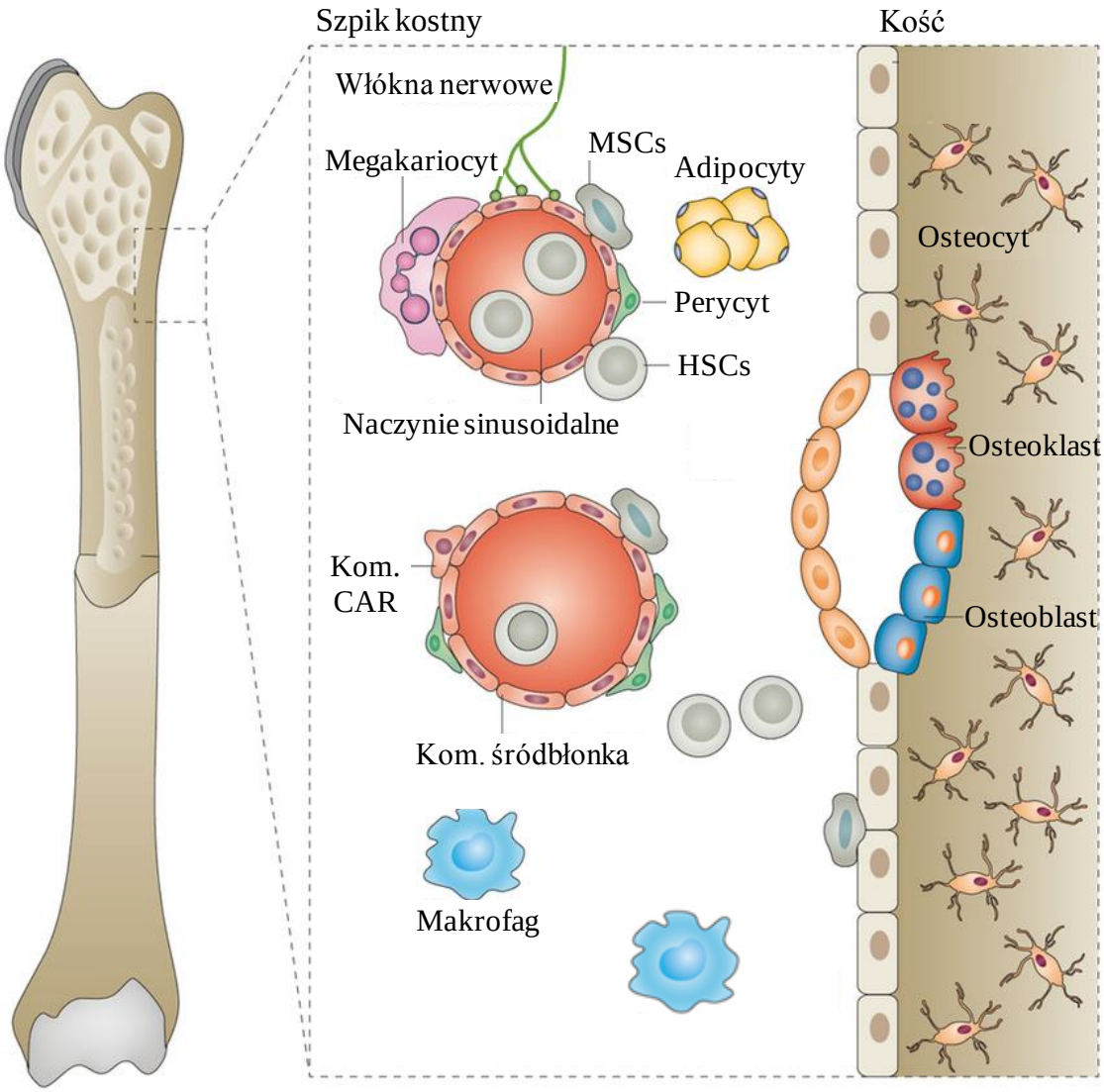
W obrębie niszy komórek HSCs, podobnie jak w przypadku innych nisz KM, wyróżnić można kilka głównych komponentów: i) komórki tworzące rusztowanie mechaniczne stromy, umożliwiające adhezyjną oraz parakrynną interakcję z KM; ii) białka macierzy zewnątrzkomórkowej, tworzące sieć strukturalną, zapewniającą komórkom miejsca przyczepu oraz odpowiednie właściwości mechaniczne regulujące transdukcję sygnału; iii) naczynia krwionośne, transportujące krew zaopatrującą komórki niszy w tlen i substancje odżywcze; oraz iv) włókna nerwowe integrujące i przekazujące bodźce regulatorowe z i do niszy (55, 63). Schemat budowy niszy komórek HSCs przedstawiono na Rycinie 2.

Spośród komponentów komórkowych niszy komórek HSCs szczególną rolę odgrywają MSCs stromy szpikowej. Pełnią one m.in. istotne funkcje regulatorowe względem komórek HSCs, głównie poprzez wydzielanie szeregu czynników parakrynnych, w tym m.in. czynnika pochodzenia stromalnego 1 (ang. *stromal cell-derived factor 1*; SDF-1), zwanego również CXCL12 (z ang. *C-X-C motif chemokine 12*), czynnika komórek macierzystych (ang. *stem cell factor*; SCF), angiopoetyny, interleukiny 7 oraz naczyniowej cząsteczki adhezyjnej 1 (ang. *vascular cell adhesion molecule 1*; VCAM1). Aktywność parakrynna tych komórek oraz ich bezpośrednia interakcja z komórkami HSCs sprawiają, że MSCs są istotną populacją odpowiedzialną za utrzymanie puli komórek HSCs w niszy oraz regulację procesu hematopoezy (64). **Jednym z istotnych mechanizmów kontroli HSCs przez niszowe komórki MSCs jest oś SDF-1 – CXCR4**. Komórki mezenchymalne zdolne są do produkcji SDF-1, będącego chemokiną wiążącą się z receptorem CXCR4 obecnym na komórkach krwiotwórczych (65). Tym samym, komórki te otrzymują sygnał do zasiedlania niszy szpikowej (tzw. *homingu*), a zaburzenie tej osi interakcji prowadzić może do wyrzutu komórek HSCs do krwiobiegu (65). Zatem, regulacja sygnałowania SDF-1 – CXCR4 odpowiada nie tylko za mobilizację tych komórek z nisz szpikowych do krwiobiegu, co wykorzystuje się m.in. w celu pozyskiwania mobilizowanej krwi obwodowej (MKO) do celów transplantacyjnych, ale odpowiada za proces migracji komórek HSCs

do szpiku i zasiedlania go po przeszczepie, co może stanowić istotny czynnik funkcjonalny warunkujący efektywną rekonstytucję szpiku kostnego przez komórki HSCs (65, 66).

Innym istotnym typem komórek obecnych w niszy szpikowej, które stranowią frakcję oddziałującą na komórki HSCs, są osteoblasty (67). Postuluje się, że wydzielane przez nie czynniki mogą stymulować komórki HSCs do ekspansji (67, 68), a adhezja HSCs do N-kadheryny obecnej na osteoblastach, moduluje ich aktywność (60, 69). Z drugiej jednak strony, inne prace badawcze wskazują na brak bezpośredniego zaangażowania oddziaływania dojrzałych osteoblastów poprzez N-kadherynę w regulacji komórek HSCs (70-72). Ponadto, wydzielana przez linię osteoblastyczną osteopontyna jest negatywnym regulatorem liczby komórek HSCs w szpiku (73). Zatem wpływ osteoblastów na hematopoezę jest niejednoznaczny i zapewne zależy również od obecności innych czynników obecnych w niszy.
W bezpośrednim sąsiedztwie komórek HSCs w ich niszy szpikowej odnaleźć można także inne populacje komórkowe, w tym przynaczyniowe komórki stromy posiadające receptor dla leptyny (komórki $LepR^{+}$), komórki CAR (ang. *CXCL12- abundant reticular cells*), regulatorowe limfocyty T, megakariocyty oraz niemielinizujące komórki Schwanna (74-78). Co ciekawe, wykazano, że również adipocyty szpikowe mogą wpływać na zachowanie komórek HSCs w ich niszy (79, 80).

Regulacja aktywacji komórek HSCs w ich natywnym środowisku zachodzi zarówno poprzez oddziaływania bezpośrednie komórka-komórka oraz komórka-macierz zewnątrzkomórkowa (ang. *extracellular matrix*; ECM), a także poprzez czynniki parakrynne, które wpływają na aktywację szeregu wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowania w KM. Jedną z kluczowych jest ścieżka od receptora Notch, aktywowana m.in. przez ligand Jagged-1 (81, 82). Innym ważnym regulatorem hematopoezy jest szlak Wnt, a liczne badania wskazują na jego promujący wpływ m.in. na proliferację komórek HSCs (83, 84). W szczególności, badania w modelu mysim świadczą o kluczowej roli białka Wnt3a, będącego składnikiem kanonicznego szlaku Wnt, w aktywacji samoodnowy komórek HSCs (85, 86). Z drugiej jednak strony wykazano, że genetyczne modyfikacje kluczowych cząsteczek w szlaku Wnt, związane m.in. z delecją β-kateniny (87) lub czynnika Porcn, regulującego wydzielanie ligandów szlaku Wnt, nie wpływają na proces hematopoezy u dorosłych osobników (88). Z kolei, w innej pracy pokazano, że myszy z brakiem ekspresji β-kateniny posiadały prawidłową liczbę komórek HSCs, jednak proces ich długoterminowej samoodnowy był zaburzony (89). Ponadto, postuluje się, że wpływ tego białka na losy HSCs zależy także od miejsca jego występowania. Przykładowo, Kim i współpracownicy pokazali, że stabilizacja β-kateniny w komórkach stromy szpiku wpływała pozytywnie na proliferację komórek HSCs, ale bezpośrednia jej stabilizacja w samych komórkach HSCs skutkowała spadkiem ich liczby (90). Dane te wskazują na mnogość możliwych punktów regulatorowych tego szlaku, mogących mieć wieloraki wpływ na komórki krwiotwórcze, zależny od innych, towarzyszących czynników (74).



Rycina 2. Schemat niszy szpikowej komórek HSCs. Zmodyfikowano na podstawie (91).

Znanych jest obecnie wiele innych regulatorów komórek HSCs, w tym wydzielana przez osteoblasty osteopontyna (73), czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (ang. *granulocyte colony-stimulating factor*; G-CSF), SCF, SDF-1 (92, 93), angiopoetyna-1 (94) oraz trompopoetyna (95). Jak już wspomniano, część z tych cytokin produkowana jest także przez komórki śródbłonka naczyniowego, MSCs oraz komórki $LepR^{+}$, które są także źródłem plejotropiny oraz cząsteczki Jagged-1 (78, 96). Ponadto, wykazano także, że cytokina CXCL-4 oraz transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *transforming growth factor beta*; TGF-β) wydzielane przez megakariocyty są również zaangażowane w regulację puli komórek HSCs (76, 97).

Warto zaznaczyć, że część wymienionych czynników parakrynnych wykazuje działanie plejotropowe, mogąc w zależności od kontekstu biochemicznego, aktywować samoodnowę komórek HSCs lub hamować progresję ich cyklu komórkowego, promując tym samym wejście tych komórek w stan wyciszenia. Tym samym, regulacja aktywności biologicznej komórek HSCs w obrębie ich niszy jest złożonym procesem, w który zaangażowane są liczne czynniki regulatorowe.

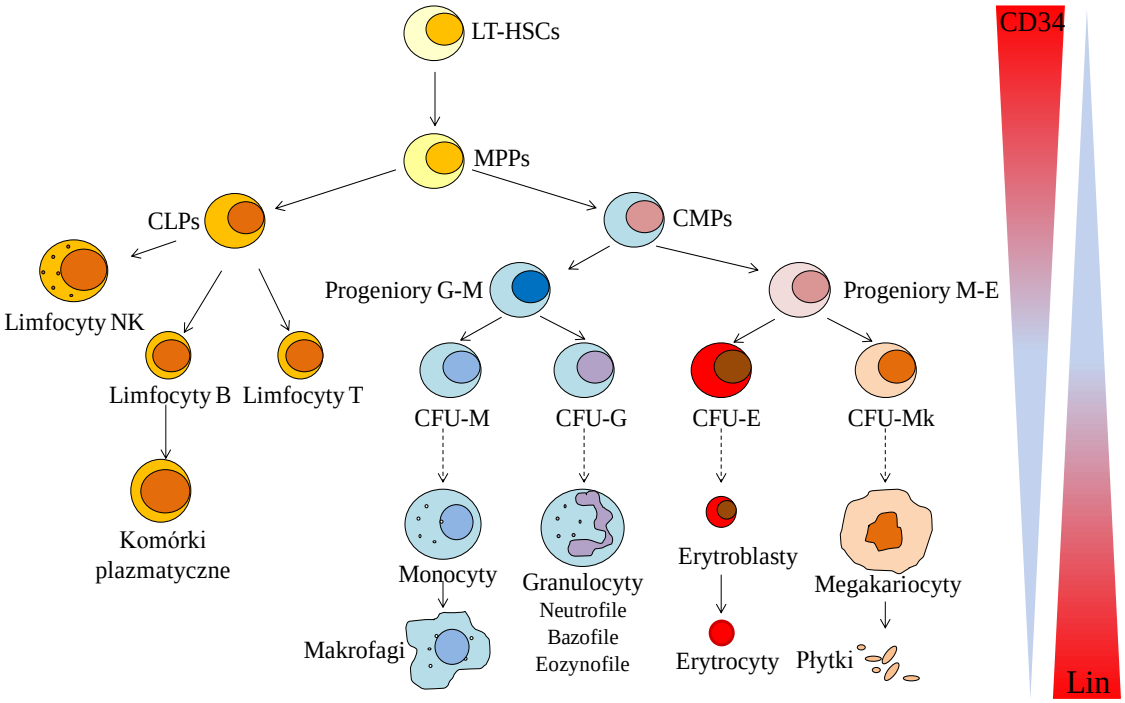
1.1.4. Proces hematopoezy i hierarchia komórek krwiotwórczych

Komórki ludzkiej krwi mają ograniczoną żywotność, sięgającą od kilku dni dla leukocytów do ok. 115 dni w przypadku erytrocytów (98, 99). Stąd też, w celu utrzymania homeostazy organizmu, konieczna jest ciągła odnowa składników morfotycznych krwi w procesie hematopoezy. Szacuje się, że ok. 500 miliardów erytrocytów jest produkowane każdego dnia, stąd też proces ten musi zachodzić w sposób ściśle kontrolowany oraz z dużą wydajnością (100). Rozpoczyna się on we wczesnych etapach rozwoju zarodkowego i trwa przez całe życie, przy czym w organizmie człowieka produkcja prymitywnych komórek erytroidalnych rozpoczyna się już w 16 dniu rozwoju zarodkowego (101), a w dalszych etapach życia zachodzi w szpiku kostnym (102).

Obecnie istnieją dwie główne koncepcje wyjaśniające początki procesu hematopoezy w rozwoju zarodkowym. Pierwsza z nich zakłada istnienie tzw. hemangioblastu, czyli populacji komórek wykazujących ekspresję receptora dla czynnika wzrostowego VEGF ($VEGFR2^+$), wykazujących jedocześnie rozwojowy potencjał hematopoetyczny oraz śródbłonkowy (103). Druga koncepcja postuluje, że linia komórek krwiotwórczych wywodzi się z komórek tzw. hemogennego śródbłonka (z ang. *hemogenic endothelium*), wykazujących ekspresję VE-kadhryny oraz czynnika transkrypcyjnego Runx1, zlokalizowanych w obszarze płodowej aorty (z ang. *aorta-gonado-mesonephros*) (104). Obecnie najbardziej prawdopodobnym scenariuszem wydaje się formowanie komórek HSCs z hemangioblastu, z pośrednim etapem hemogennego śródbłonka (105). W dalszych etapach ontogenezy, wczesne komórki HSCs przemieszczają się następnie w kierunku płodowej wątroby oraz śledziony, a następnie migrują one do nisz szpikowych, czyli ostatecznego miejsca hematopoezy, zachodzącej również w okresie postnatalnym (106).

Hematopoeza jest wieloetapowym procesem, którego konsekwencją z jednej strony jest powstawanie dojrzałych komórek krwi, z drugiej zaś hierarchizacja komórek krwiotwórczych, o zmiennym potencjale do samoodnowy oraz różnicowania (Rycina 3). Na szczycie hierarchii komórek układu hematopoetycznego znajdują się prymitywne, „długoterminowe" komórki HSCs (ang. *long-term HSCs;* LT-HSCs), cechujące się niską aktywnością proliferacyjną w warunkach homeostazy, ale wysokim potencjałem do rekonstytucji układu krwiotwórczego w eksperymentach z seryjnymi przeszczepami (40, 107). LT-HSCs zdolne są nie tylko do samoodnowy puli komórek krwiotwórczych, ale także różnicują w multipotencjalne komórki progenitorowe (ang. *multipotent progenitor cells*; MPPs), będące prekursorami dwóch głównych linii hematopoetycznych: limfoidalnej oraz mieloidalnej (108). Progenitory linii limfoidalnej (ang. *common lymphoid progenitors*; CLPs) różnicują następnie w limfocyty T, B lub NK, natomiast linia mieloidalna (ang. *common myeloid progenitors*; CMPs) rozgałęzia się rozwojowo w kierunku progenitorów granulocytarno-makrofagowych oraz megakariocytarno-erytroidalnych, ulegającym dalszej specyfikacji i różnicowaniu (109). Ponadto, w przebiegu procesu hematopoezy wyróżnia się wiele stadiów pośrednich zróżnicowania poszczególnych progenitorów, a wraz z postępem

ukierunkowania liniowego, spada potencjał komórek HSCs do przekształacania się w inne linie komórek krwi (110, 111).



Rycina 3. Uproszczony schemat procesu hematopoezy oraz hierarchii komórek hematopoetycznych. LT-HSCs – HSCs odpowiedzialne za długoterminową rekonstytucję hematopoezy (ang. *long-term HSCs*); MPPs – multipotencjalne komórki progenitorowe (ang. *multipotent progenitor cells*); CLPs – progenitory linii limfoidalnej (ang. *common lymphoid progenitors*); CMPs – progenitory linii mieloidalnej (ang. *common myeloid progenitors*); CFU –jednostka tworząca kolonię (ang. *colony forming unit*) makrofagową (M), granulocytarną (G), erytroidalną (E) lub megakariocytarną (Mk). Lin – skrót od angielskiego słowa *lineage* – odnoszący się do najważniejszych antygenów tzw. liniowych, obecnych na dojrzałych komórkach krwi.

Hierarchiczność komórek hematopoetycznych przejawia się nie tylko w ich zróżnicowanym potencjale do samoodnowy i ukierunkowania liniowego związanego z różnicowaniem, ale także w różnorodności fenotypowej komórek krwiotwórczych, służącej ich identyfikacji. Przykładowo, wykazano, że komórki $CD34^{+}CD38^{-}$ są zdolne do długoterminowej repopulacji szpiku, natomiast komórki $CD34^{+}CD38^{+}$ mają możliwość jedynie repopulacji krótkoterminowej (112). Dalsze badania wskazały na istotną rolę także innych markerów powierzchniowych w definiowaniu lokalizacji danej subpopulacji komórek HSCs w ich hierarchii. Wykazano m.in., że komórki o fenotypie $CD34^{+}CD38^{-}CD90^{+}CD45RA^{-}$ posiadają wysoki potencjał repopulacyjny *in vivo*, natomiast frakcje $CD34^{+}CD38^{-}CD90^{-}CD45RA^{-}$ oraz $CD34^{+}CD38^{-}CD90^{-}CD45RA^{+}$ zawierają głównie multipotencjalne progenitory (113).

Jak wspomniano, hematopoeza jest skomplikowanym procesem biologicznym, dlatego też wymaga ona ścisłej kontroli oraz wieloetapowej regulacji. Ukierunkowanie komórek HSCs na drogę różnicowania w dany typ progenitorów, a ostatecznie

dojrzałych elementów morfotycznych krwi, uzależnione jest m.in. od aktywności czynników transkrypcyjnych, decydujących o aktywacji konkretnych genów związanych z hematopoezą. Przykładowo, w rozwoju zarodkowym czynnik Runx1 odpowiada za wyodrębnienie się linii komórek LT-HSCs z hemangioblastu (114). Z kolei, czynnik transkrypcyjny Ikaros jest kluczowy dla aktywacji różnicowania limfoidalnego w tych komórkach (115), podczas gdy GATA-1 stymuluje erytropoezę, antagonizując z czynnikiem PU.1 promującym mielopoezę (116).

Oprócz udziału czynników transkrypcyjnych, proces hematopoezy może być regulowany za pomocą parakrynnych sygnałów pochodzących z niszy komórek HSCs, w tym cytokin oraz czynników wzrostowych, wydzielanych przez sąsiednie komórki, co omówiono szerzej w Podrozdziale 1.1.3. pt. *Nisza komórek hematopoetycznych*.

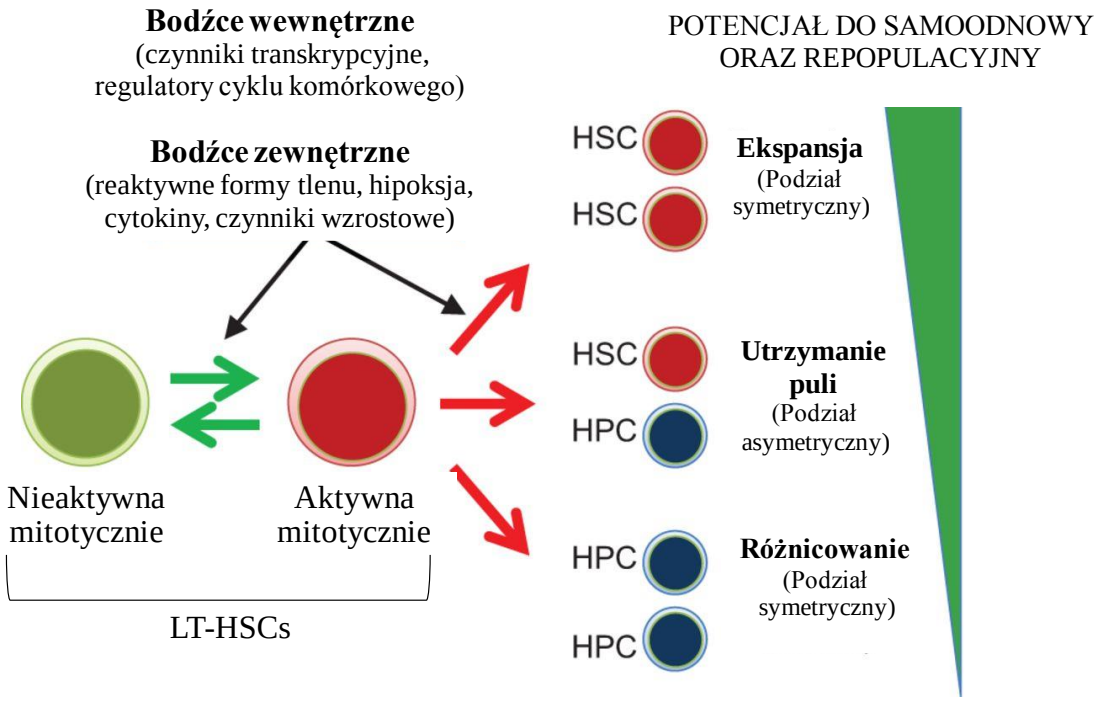
Warto także zaznaczyć, że wraz z różnicowaniem progenitorów w poszczególne linie hematopoetyczne zmienia się profil ekspresji genów, skutkujący pojawianiem się zmian morfologicznych oraz antygenowych tych komórek. Zmiany te manifestują się m.in. modyfikacją fenotypu, związaną ze spadkiem ekspresji antygenu CD34, przy jednoczesnym pojawianiu się poszczególnych markerów powierzchniowych, charakterystycznych dla danej linii hematopoetycznej (tzw. markerów liniowych) (117). Zmianom tym towarzyszy także ukierunkowywanie się tych komórek, co do ich funkcji pełnionych w układzie immunologicznym i krwionośnym.

1.1.5. Regulacja puli komórek HSCs w organizmie

W warunkach homeostazy większość komórek HSCs nie wykazuje aktywności mitotycznej, a ich aktywacja prowadząca do progresji cyklu komórkowego zachodzi na drodze reakcji na bodźce wewnętrzne i zewnętrzne, w tym m.in. na sygnały od cytokin i czynników wzrostu (Rycina 4) (118). Bodźce te mogą też mieć często podłoże stresowe, wywołane m.in. uszkodzeniami tkanek lub DNA (119).

Jak wspomniano, badania nad układem krwiotwórczym wykazały obecność w niszach krwiotwórczych populacji komórek LT-HSCs, które dzielą się bardzo rzadko (średnio raz na ok. 45 tygodni) (120), zachowując przy tym pełny potencjał do regeneracji układu krwiotwórczego w eksperymentach z seryjnymi przeszczepami (121, 122). Dlatego też, uważane są one za najbardziej prymitywną (tj. wczesną rozwojowo) subpopulację komórek HSCs, stanowiącą rezerwuar ich puli w organizmie (123).

Proliferacja komórek HSCs regulowana jest m.in. przez cykliny, kinazy zależne od cyklin oraz ich inhibitory, a także przez szereg czynników transkrypcyjnych, w tym m.in. E2F (124). Wykazano również istotną rolę białek p53 (125) oraz Msi2 (z ang. *Musashi2*) (126) jako pozytywnych regulatorów proliferacji HSCs, a także kluczową rolę aktywności szlaku białka białaczki promielocytowej (ang. *promyelocytic leukemia*; PML) i receptora typu δ z rodziny PPAR (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor δ*; PPAR-δ) w kontroli podziałów komórek HSCs (127). Nie bez znaczenia w regulacji puli komórek krwiotwórczych pozostaje również status metylacji ich DNA (128).



Rycina 4. Mechanizmy kontroli puli komórek HSCs. Zmodyfikowano na podstawie (129).

Liczebność komórek krwiotwórczych w ich niszy komórkowej determinuje stosunek podziałów symetrycznych do asymetrycznych (Rycina 4) (130, 131). W przypadku pierwszego typu, po mitozie powstają dwie komórki potomne, zachowujące właściwości komórek macierzystych. Ewentualnie, mogą także powstać dwie ukierunkowane liniowo komórki progenitorowe, przy czym taka sytuacja prowadzić może do szybkiego wyczerpania puli HSCs (132). Z kolei, podziały asymetryczne skutkują powstaniem jednej komórki potomnej oraz jednej progenitorowej, umożliwiając odnowę liczebności HSCs, przy jednoczesnym podtrzymaniu procesu hematopoezy (122). Co ciekawe, wykazano, że liczba podziałów, jakim ulegają komórki krwiotwórcze jest ściśle kontrolowana, przy czym po czwartym symetrycznym podziale komórki LT-HSCs przechodzą w stan braku aktywności podziałowej. Ponadto, czas pomiędzy kolejnymi ich podziałami ulega stopniowemu wydłużeniu (123). Liczne prace sugerują także, że ekspansji tych komórek towarzyszy spadek ich właściwości regeneracyjnych (119, 123).

Paradoksalnie jednak wykazano, że pomimo obserwowanego - wraz ze starzeniem, spadku potencjału hematopoetycznego komórek krwiotwórczych, ich sumaryczna liczba zwiększa się wraz z wiekiem osobnika, przy jednoczesnym wzroście odsetka komórek linii mieloidalnej (133-135). Świadczy to o wysokim stopniu złożoności kontroli puli komórek HSCs w organizmie oraz o wieloaspektowej naturze tego procesu, która dodatkowo może ulegać zmianie wraz z wiekiem organizmu.

1.1.5. Metody oceny właściwości biologicznych i funkcjonalnych komórek HSCs

Ocena cech fenotypowych oraz funkcjonalnych komórek HSCs wymagana jest nie tylko dla potrzeb badań podstawowych, ale jest ona także konieczna w praktyce klinicznej. Ma na celu m.in. analizę składu badanej tkanki, a także monitorowanie jakości materiału klinicznego zawierającego komórki HSCs przed jego przeszczepem. Ponadto, służy ona analizie przed, w trakcie oraz po okresie krioprezerwacji materiału przeszczepowego, decydując o przydatności do dalszego przechowywania oraz ewentualnego użycia do celów medycznych (136).

Obecnie, w celu zbadania właściwości komórek HSCs w praktyce laboratoryjnej, dostępny jest szereg podstawowych oraz specjalistycznych analiz, przeprowadzanych zarówno w testach *in vitro*, jak i *in vivo* (Tabela 1). Najprostszą metodą oceny komórek *in vitro* jest ich obserwacja mikroskopowa. Do tej pierwszej grupy analiz zalicza się także wieloantygenową analizę fenotypową komórek, pozwalającą na określenie profilu ekspresji poszczególnych antygenów powierzchniowych, będących markerami danej populacji komórek krwiotwórczych oraz zróżnicowanych z nich komórek potomnych. Doskonałym narzędziem umożliwiającym przeprowadzenie takiej analizy jest cytometria przepływowa. Pozwala ona w relatywnie krótkim czasie zbadać wieloantygenowy profil tysięcy, a nawet milionów komórek obecnych w próbce, poddanych uprzednio znakowaniu immunofluorescencyjnemu (137). Ponadto, w warunkach *in vitro* stosuje się także szereg testów funkcjonalnych, opartych o hodowle komórek w różnych warunkach. Takie hodowle *ex vivo* umożliwiają ocenę aktywności proliferacyjnej komórek HSCs, ich potencjału do różnicowania oraz reakcji na czynniki wzrostowe obecne w pożywce. W ten sposób bada się także liczebność progenitorów hematopoetycznych w danym izolacie tkankowym czy wpływ procesu izolacji, oczyszczania oraz innych manipulacji na żywotność i funkcjonalność komórek (138). Przykładami takich analiz komórek HSCs w hodowlach są testy klonogenności (ang. *colony-forming cell assay*; CFC), w których wysiewa się komórki zawieszone w półpłynnej pożywce z dodatkiem metylocelulozy oraz odpowiednich cytokin i/lub czynników wzrostowych (139). W takich warunkach komórki HSCs tworzą kolonie hematopoetyczne, których rodzaj zależy od potencjału komórek oraz obecności odpowiednich progenitorów, a identyfikacja kolonii bazuje głównie na ocenie ich morfologii (140). Test klonogenności stanowi także dodatkowy wskaźnik jakości materiału klinicznego, o czym świadczyć może obserwowana korelacja jego wyników z poprzeszczepową efektywnością rekonstutucji układu krwiotwórczego u pacjentów (141, 142).

Innym rodzajem testu funkcjonalnego *in vitro* są hodowle długoterminowe, służące głównie do oceny obecności prymitywnych progenitorów, tzw. komórek LTC-ICs (ang. *long-term culture initiating cells*) (143). Prowadzi się je zazwyczaj w systemie ko-kultury, gdzie zawiesinę komórek HSCs wysiewa się na warstwę adherentnych komórek stromy w odpowiedniej pożywce. Hodowlę taką można prowadzić przez wiele tygodni, zliczając powstałe kolonie hematopoetyczne i przesiewając je w celu wykonania także testu klonogenności CFC (144).

Tabela 1. Wybrane metody analizy właściwości biologicznych i funkcjonalnych komórek krwiotwórczych.

Rodzaj analizy	Przykład analizy	Oceniana cecha
Bezpośrednio w materiale biologicznym	analiza fenotypowa	ocena składu komórkowego, w tym np. odsetka komórek $CD34^+$ oraz obecności poszczególnych subpopulacji komórek HSCs
	analiza jakościowa	ocena żywotności komórek
Ex vivo/in vitro	hodowla krótkoterminowa	ocena potencjału proliferacyjnego i odpowiedzi na testowane czynniki zawarte w pożywce hodowlanej
	test tworzenia kolonii	analiza potencjału do formowania różnych typów kolonii hematopoetycznych
	hodowla długoterminowa w systemie ko-kultury	ocena obecności komórek LTC-ICs
	test chemotaksji	analiza migracyjnej odpowiedzi komórek na gradient chemoatraktanta (np. SDF-1)
	test adhezji	ocena zdolności do interakcji z białkami macierzy oraz komórkami obecnymi w mikrośrodowisku niszy
In vivo	jednokrotny przeszczep komórek do myszy z upośledzoną odpornością	ocena zdolności komórek do zasiedlania nisz szpikowych i ich potencjału repopulacyjnego
	seryjne przeszczepy komórek do myszy z upośledzoną odpornością	ocena obecności komórek LT-HSCs w materiale przeszczepowym

Odmianą tego testu funkcjonalnego jest ocena tworzenia tzw. kolonii CAFC (z ang. *cobblestone area-forming cell*), w którym nie przesiewa się ponownie powstałych kolonii, ale ocenia się ich morfologię, w celu identyfikacji obszarów przypominających strukturę kostki brukowej (145). Jednakże badania wskakują, że test ten jest mniej obiektywny i nie odzwierciedla realnej liczebności komórek LTC-ICs w badanej próbce (146).

Warto także zaznaczyć, że oprócz testów bazujących na ocenie ilościowej i jakościowej komórek HSCs w materiale biologicznym, prowadzi się także badania mające na celu analizę innych cech funkcjonalnych. Przykładem takich testów *in vitro* jest m.in. analiza potencjału do aktywnej odpowiedzi chemotaktycznej oraz adhezji do innych komórek. Testy te mają za zadanie ocenę funkcjonalności komórek HSCs w kontekście efektywności ich migracji z miejsca podania do niszy szpikowej, jako etapu niezbędnego do prawidłowego zasiedlenia SzK i podjęcia procesów krwiotworzenia (147, 148).

Drugą, niezwykle istotną grupę testów funkcjonalnych, oceniających potencjał biologiczny komórek HSCs, stanowią testy *in vivo*. Służą one głównie do oceny potencjału tych komórek do zasiedlania nisz szpikowych oraz rekonstytucji układu krwiotwórczego po ich przeszczepie. W badaniach tych powszechnie wykorzystuje się modele zwierzęce, z zastosowaniem głównie myszy z upośledzoną w wyniku odpowiednich modyfikacji genetycznych odpornością, co ma na celu zmniejszenie ryzyka odrzucenia przeszczepu. Najczęściej wykorzystuje się myszy szczepu NOD/SCID (z ang. *nonobese diabetic–severe combined immunodeficiency disease*), wykazujące dysfunkcję limfocytów T, B oraz NK, a także niższy poziom produkcji cytokin (149). Obecnie dostępnych jest kilka wariantów NOD/SCID o różnym stopniu deficytów immunologicznych, m.in. myszy IL-2Rγ^{null} NOD/SCID czy B2m^{null} NOD/SCID, w których dodatkowe mutacje pogłębiają zaburzenie rozwoju limfocytów T i B oraz skutkują brakiem limfocytów NK (150, 151). Takie szczepy umożliwiają długoterminowe eksperymenty, z wyższym poziomem rekonstytucji szpiku po przeszczepie (152, 153).

Zastosowanie myszy z upośledzoną odpornością umożliwia podanie ludzkich komórek w układzie ksenogenicznym (międzygatunkowym), przy jednoczesnym niskim ryzyku odrzucenia przeszczepu przez układ immunologiczny zwierzęcia. „Złotym standardem" jest dożylne lub doszpikowe podanie materiału zawierającego komórki HSCs do subletalnie naświetlonych myszy, a następnie ocena ich zdolności do rekonsytutucji układu hematopoetycznego, poprzez analizę obecności ludzkich komórek w mysich tkankach (głównie szpiku, krwi obwodowej oraz śledzionie) kilka tygodni, a nawet miesięcy od przeszczepu. Częstą praktyką są także eksperymenty z seryjnymi przeszczepami mysiego szpiku zawierającego ludzkie komórki, umożliwiające m.in. ocenę obecności komórek LT-HSCs o wysokim potencjale repopulacyjnym (154). Odmianą testów *in vivo* są przeszczepy komórek HSCs w systemie kompetycyjnym, gdzie naświetlonym myszom z upośledzoną odpornością

podaje się jednocześnie dwa typy komórek HSCs, różniące się np. pochodzeniem od różnych dawców, statusem genetycznym czy sposobem manipulacji przed podaniem, umożliwiając tym samym bezpośrednie porównanie ich potencjału repopulacyjnego (155).

1.2. Wykorzystanie krwi pępowinowej jako źródła HSCs w medycynie transplantacyjnej

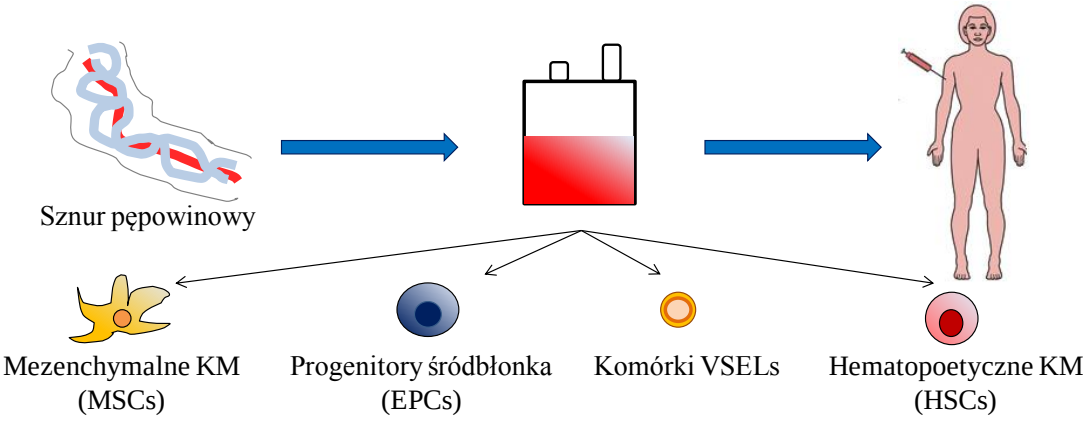
1.2.1. Krew pępowinowa jako bogate źródło komórek macierzystych

Krew pępowinowa stanowi krew pozostałą w łożysku oraz sznurze pępowinowym po porodzie. Stanowi ona bogate źródło różnych typów KM (Rycina 5), w tym w szczególności komórek HSCs (156). Pozyskuje się ją zazwyczaj poprzez nakłucie żyły pępowinowej, a następnie drenaż grawitacyjny w zamkniętym układzie do sterylnego worka kolekcyjnego zawierającego antykoagulant (157). Istnieją dwie alternatywne metody pobierania KP: *in utero*, gdy łożysko wciąż znajduje się w macicy oraz *ex utero*, po porodzie łożyska, przy czym wykazano, że pierwszy wariant umożliwia odzysk większej objętości krwi oraz liczby komórek $CD34^+$ (158). W następnej kolejności, pobrany materiał poddaje się obróbce w celu redukcji objętości i przygotowania do krioprezerwacji. Etap ten jest krytyczny dla prawidłowego zabezpieczenia materiału przed utratą jego właściwości terapeutycznych. Tradycyjnie polega on na wirowaniu w buforze HES (z ang. *hydroxyethyl starch*), powodującym usunięcie erytrocytów i zagęszczenie leukocytów, które mieszane są następnie z czynnikiem do krioprezerwacji (159). Jednakże, badania wykazały, że zastosowanie alternatywnej metody, polegającej na zagęszczeniu krwi w wyniku pozbycia się osocza, a nie czerwonych krwinek, daje znacząco lepszy odzysk komórek jądrzastych, a tym samym mniejsze straty liczby KM (160, 161). Wzbogacenie zagęszczonego materiału w erytrocyty może jednak prowadzić do późniejszych potencjalnych powikłań związanych z nefrotoksycznością (162).

Pierwsze prace świadczące o obecności komórek krwiotwórczych w KP zostały opublikowane w latach ’70 ubiegłego wieku, gdzie wykazano obecność w tym materiale progenitorów tworzących kolonie granulocytarne (163). Późniejsze badania jednoznacznie potwierdziły, że **KP zawiera komórki HSCs w liczbie ok. 10-krotnie wyższej w porównaniu do krwi dorosłego człowieka** (156, 164). Dodatkowo, wykazano, że wyższa liczba HSCs obecnych w KP koreluje z mniejszym ryzykiem powikłań u wcześniaków (165). Co istotne, wykazano także, że KP zawiera zarówno prymitywne komórki krwiotwórcze, jak i progenitory o różnym stadium zróżnicowania i ukierunkowania liniowego (164). Ponadto, komórki te, jako pochodzące od noworodka, są mniej dojrzałe immunologicznie oraz bardziej prymitywne w porównaniu do HSCs izolowanych z dorosłego organizmu, co niesie za sobą szereg korzyści w kontekście możliwości ich zastosowania medycznego (166-168).

Oprócz komórek krwiotwórczych, KP zawiera także inne populacje KM, w tym komórek niehematopoetycznych, do których zaliczamy m.in. progenitory śródbłonkowe (ang. *endothelial progenitor cells*; EPCs). Podobnie jak w przypadku komórek HSCs, wykazano, że liczba komórek EPCs w KP jest wyższa w porównaniu z krwią obwodową (169). Co ciekawe, ich liczba jest także podwyższona w KP wcześniaków, w porównaniu do dzieci urodzonych w planowanym terminie (170). Na uwagę zasługuje także fakt, że EPCs wyizolowane z KP wykazują wyższy potencjał regeneracyjny w niedotlenionych tkankach, w porównaniu do komórek z krwi dorosłych osobników (171). To sprawia, że KP jest potencjalnie interesującym materiałem do zastosowań klinicznych nie tylko w hematologii, ale także w leczeniu uszkodzeń innych tkanek, w tym tych wymagających aktywacji procesów angiogenezy (172). Warto jednak wspomnieć, że jednoznaczna identyfikacja fenotypowa EPCs w KP i odróżnienie ich od HSCs bywa kłopotliwa, gdyż brak jest obecnie markerów typowych tylko dla komórek EPCs. Dlatego też, ich obecność stwierdza się głównie w testach funkcjonalnych, m.in. w teście tworzenia kolonii endotelialnych (173). Niemniej jednak, w identyfikacji fenotypowej tych komórek kluczowym wydaje się antygen CD45. Obecność komórek EPCs z KP stwierdzono bowiem we frakcjach $CD34^{+}CD45^{-}$ lub $CD34^{+}CD133^{+}CD45^{low/dim}$, w przeciwieństwie do komórek linii hematopoetycznej wykazujących wyższą ekspresję tego markera (174, 175).

Inną populacją komórek obecnych w KP są multipotencjalne komórki MSCs, które izoluje się, podobnie jak w przypadku SzK, jako frakcję adherentną komórek jądrzastych KP (176). Wykazano ponadto, że komórki te posiadają fenotyp oraz cechy funkcjonalne podobne do szpikowych MSCs, w tym zdolność do wielokierunkowego różnicowania (177-179). Pomimo, że w przypadku tkanek poporodowych sznur pępowinowy wydaje się być obecnie lepszym źródłem tych komórek (180), podejmuje się próby zastosowania MSCs z KP w praktyce klinicznej (181, 182).



Rycina 5. KP jako źródło różnych typów KM do zastosowań terapeutycznych. Na rycinie wykorzystano fragment grafiki dostępnej na stronie *www.drugs.com/health-guide/images/205426.jpg*.

Oprócz wymienionych powyżej typów KM, wykazano także, że KP wzbogacona jest w bardzo małe (<7μm) komórki macierzyste o cechach komórek embrionalnych (ang. *very small embryonic-like stem cells*; VSELs). Populacja ta została scharakteryzowana jako rzadka frakcja komórek o fenotypie $FSC^{low}CD45^{-}Lin^{-}CD133^{+}$, posiadających duże jądro z prymitywną euchromatyną oraz ekspresję czynników transkrypcyjnych związanych z pluripotencją, takich jak Oct-4A czy Nanog (183, 184). Ponadto wykazano, że choć populacja ta należy do przedziału komórek niehematopoetycznych, to jednak w pewnych warunkach hodowlanych może ona dawać początek koloniom hematopoetycznym *in vitro* oraz ulegać wszczepieniu do szpiku kostnego *in vivo*, co nasuwa przypuszczenia, że mogą one znajdować się na szczycie hierarchi KM (185, 186).

1.2.2. Zastosowanie krwi pępowinowej jako materiału przeszczepowego w praktyce klinicznej

Przeszczepy komórek hematopoetycznych, przeprowadzane od lat 60 ubiegłego wieku, są obecnie powszechnie stosowaną strategią rekonstytucji układu krwiotwórczego, m.in. w chorobach hematologicznych i autoimmunologicznych (187, 188). Ratują one także życie pacjentom z chorobami nowotworowymi, leczonymi z zastosowaniem radio- lub chemioterapii, których jednym ze skutków ubocznych jest wyniszczenie układu krwiotwórczego (189).

Obecnie, SzK oraz MKO stanowią główne źródła komórek krwiotwórczych do zastosowań klinicznych. W optymalnym przypadku, materiał przeszczepowy podaje się w systemie autologicznym, co znacząco zwiększa szanse na odbudowę układu krwiotwórczego, przy jednoczesnej minimalizacji ryzyka wystąpienia powikłań. Należy do nich głównie możliwość odrzucenia przeszczepu lub wystąpienia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (ang. *graft-versus host disease*, GvHD), wynikających z niedostatecznego dopasowania profilu antygenów zgodności tkankowej (ang. *human leukocyte antigen;* HLA) (190).

Jednakże, według danych statystycznych, spośród ponad 50 tysięcy przeprowadzonych transplantacji komórek krwiotwórczych pochodzenia szpikowego, prawie połowę stanowią przeszczepy allogeniczne, przy czym odsetek ten zależy od typu choroby (191). Wynika to często z braku możliwości podania pacjentowi jego własnych komórek, będącego konsekwencją typu choroby lub stadium jej zaawansowania oraz obecności defektu genetycznego w samych komórkach krwiotwórczych (192). **Wzrost liczby chorych wymagających przeszczepu HSCs rodzi poważne problemy wynikające z braku wystarczającej liczby potencjalnych dawców**. Dla przykładu, szacuje się, że spośród mieszkańców Ameryki Północnej wymagających pilnej transplantacji, w przypadku aż 30-40 % nie można znaleźć odpowiedniego dawcy pod względem zgodności tkankowej (187). Zatem, poszukiwania innych, optymalnych źródeł materiału allogenicznego dla tych pacjentów stanowią aktualne wyzwanie kliniczne. Dlatego też, **coraz większe zainteresowanie budzi**

wykorzystanie KP jako materiału przeszczepowego będącego źródłem HSCs, stanowiącego alternatywę dla SzK oraz MKO (193).

Koncepcja wykorzystania KP w transplantologii zrodziła się na początku lat ’80 ubiegłego wieku, skutkując utworzeniem firmy Biocyte, której działania przyczyniły się do rozpoczęcia badań nad możliwością krioprezerwacji KP. Dalsze analizy wykazały, że materiał ten zawiera HSCs o wysokim potencjale proliferacyjnym, który utrzymuje się po rozmrożeniu przechowywanych jednostek KP (194). Prace te otworzyły drogę do przeprowadzenia pierwszej transplantacji KP, która miała miejsce w 1988 roku we Francji. Biorcą było 5-letnie dziecko chore na anemię Fanconiego, któremu podano KP pobraną przy porodzie zdrowej siostry. Co ważne, przeszczep ten zakończył się pełnym sukcesem, z całkowitą rekonstytucją układu krwiotwórczego u pacjenta (195). Fakt ten otworzył nowe możliwości wykorzystania KP w medycynie, co zaowocowało powstaniem publicznych oraz prywatnych banków krwi na całym świecie, gdzie jednostki KP są przechowywane w ściśle kontrolowanych warunkach nawet przez wiele lat. Szacuje się, że od czasu pierwszego przeszczepu, poddano bankowaniu na świecie około 600 tysięcy jednostek, z czego wykorzystano około 30 tysięcy (164, 196).
Początkowo, KP podawana była głównie w układzie autologicznym lub biorcom spokrewnionym, będącym rodzeństwem dziecka, przy którego porodzie pobrano materiał. Z czasem jednak podjęto próby przeszczepów od dawców niespokrewnionych Ich rezultaty wskazywały, że KP jest dobrą alternatywą dla przeszczepów SzK w leczeniu zarówno chorób nowotworowych, jak i niezwiązanych z procesem nowotworzenia (197-199). Tym samym, **KP znalazła terapeutyczne zastosowanie u dzieci cierpiących m.in. na ostre białaczki limfo- i mielocytarne, przewlekłe białaczki szpikowe, chłoniaki Hodgkin’a, ciężką niedokrwistość aplastyczną, anemie, talasemie, niedobory odporności, a także choroby metaboliczne** (194, 200-203).

Obecnie, podejmuje się także działania zmierzające do poszerzenia zakresu jednostek chorobowych, w terapii których pomocnym byłoby wykorzystanie KP. Przykładem mogą być obiecujące wyniki prób zastosowania tego materiału klinicznego w **leczeniu autyzmu** dziecięcego (204), **udaru** mózgu (205), a nawet **niewydolności nerek** (206). Ponadto, wzrasta także liczba badań nad wykorzystaniem KP jako źródła nie tylko HSCs, ale także innych typów KM, wykazujących właściwości terapeutyczne. Na chwilę obecną zarejestrowanych jest już kilkadziesiąt badań klinicznych, dotyczących podawania KP lub wyizolowanych z nich komórek MSCs, pacjentom cierpiącym na **choroby sercowo-naczyniowe, neurodegeneracyjne, metaboliczne oraz układu kostnego** (182). Opracowano także nowatorskie podejście w zastosowaniu autologicznej KP u wcześniaków, u których nastąpiła okołoporodowa utrata krwi własnej – zamiast transfuzji krwi allogenicznej od dawców dorosłych (207).

Tym samym, wymienione strategie opracowywane na całym świecie celem lepszego wykorzystania potencjału regeneracyjnego KP, potwierdzają, że jest ona cennym źródłem KM o wysokim potencjale do zastosowania w praktyce klinicznej.

1.2.3. Zalety oraz ograniczenia wykorzystania krwi pępowionowej w praktyce klinicznej

Zastosowanie KP w medycynie transplantacyjnej niesie ze sobą szereg korzyści w porównaniu do tradycyjnych źródeł KM obecnych w dorosłym organizmie. KP jest poporodowym materiałem „odpadowym", zatem jej **pobranie jest całkowicie nieinwazyjne** i nie stanowi żadnego zagrożenia ani dla matki ani dla nowonarodzonego dziecka. Ponadto, w przeciwieństwie do tradycyjnych przeszczepów, podanie KP nie niesie ze sobą wyraźnego ryzyka przeniesienia latentnych chorób wirusowych (166). Jednakże, jedną z kluczowych zalet KP w porównaniu do przeszczepu SzK lub MKO jest fakt, że jej zastosowanie obarczone jest **mniej restrykcyjnymi wymaganiami zgodności antygenów HLA, a także mniejszym ryzykiem wystąpienia GvHD** (166, 208). Wykorzystanie KP w medycynie transplantacyjnej otwiera również nowe możliwości przeszczepu komórek krwiotwórczych wśród osób z mniejszości etnicznych, dla których ciężko jest znaleźć odpowiedniego dawcę szpiku (209). Ponadto, dzięki szczegółowej analizie i dokumentacji jednostki KP przed jej bankowaniem, **okres poszukiwania zgodnego dawcy trwa zazwyczaj kilka dni**, w przeciwieństwie do czasu niezbędnego dla znalezienia zgodnego dawcy SzK, mogącego trwać nawet kilka miesięcy (210, 211).

Istotną kwestią dla sukcesu transplantacji jest odpowiednio duża liczba podanych komórek $CD34^+$, szacowana na $3\text{-}4 \cdot 10^6$/kg masy ciała (212). Istotne znaczenie ma także liczba wszystkich komórek jądrzastych obecnych w materiale przeszczepowym, która powinna wynosić powyżej $2{,}5 \cdot 10^7$/kg masy ciała biorcy (213). Wymóg ten jest głównym czynnikiem limitującym możliwość medycznego zastosowania KP u dorosłych pacjentów (214). Ponadto, w przypadku SzK lub MKO pobiera się je bezpośrednio przed przeszczepem, co umożliwia tym samym dostosowanie objętości materiału do masy ciała biorcy. Z kolei **KP pobierana jest jednorazowo przy porodzie, a limitowana objętość danej jednostki, zależna m.in. od cech osobniczych dawcy, przebiegu porodu oraz doświadczenia osoby pobierającej, skutkuje często liczbą komórek HSCs, niewystarczającą do skutecznej rekonstytucji szpikowej u dorosłych pacjentów.** W konsekwencji, głównymi skutkami niepowodzenia przeszczepów z zastosowaniem KP jest opóźnienie wbudowania oraz pierwotna niewydolność przeszczepu (ang. *primary graft failure*), mogące stanowić realne zagrożenie dla życia pacjenta (168, 215). Podsumowanie najważniejszych zalet oraz wad zastosowania KP w medycynie transplantacyjnej zestawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Porównanie cech SzK/MKO oraz KP jako materiału przeszczepowego do zastosowań klinicznych. Opracowano na podstawie (192), http://www.nationalcordbloodprogram.org/qa/comparison.html oraz prezentacji "*Proposal for cord blood banking and therapeutics business*", dostępnej online: https://www.slideshare.net/ProteusVenturePartners/proposal-for-cord-blood-banking-and-therapeutics-business-roll-up-strategy-september-2011v-6.

Cecha	SzK/MKO	KP
Ryzyko pobrania materiału	umiarkowane, wymagany zabieg w znieczuleniu lub kondycjonowanie dawcy	znikome
Wymóg zgodności w obrębie antygenów HLA	8/8	4/6
Dostępność dla mniejszości etnicznych	utrudniona	znaczna
Ryzyko GvHD	wysokie	niskie
Ryzyko przeniesienia utajonych chorób wirusowych	wysokie	niewielkie
Czas poszukiwania dawcy	miesiące	dni
Możliwość ponownego przeszczepu od dawcy	tak	nie
Limitacja liczby pobranych komórek	niska	istotna
Dostępność	ok. 15 mln potencjalnych dawców na świecie	ok. 600 tyś. zbankowanych jednostek na świecie
Szacunkowy średni czas wszczepienia	18 dni	26 dni

1.2.4. Strategie zwiększenia efektywności terapeutycznej komórek HSCs z krwi pępowinowej

Pomimo rosnącego zainteresowania KP jako źródłem KM, w szczególności HSCs, przed badaczami oraz klinicystami wciąż stoi wiele wyzwań mających na celu minimalizację istniejących limitacji związanych z możliwościami praktycznego wykorzystania tego materiału w medycynie. Jak już wspomniano, kluczowym problemem ograniczającym skuteczne zastosowanie KP u większej liczby chorych, wydaje się być niewystarczająca liczba komórek krwiotwórczych w pobranym materiale (216, 217). Tym samym, początkowe sukcesy przeszczepów KP u dzieci nie znalazły odzwierciedlenia w przypadku dorosłych pacjentów, gdzie odsetek zgonów w ciągu 100 dni od przeszczepu wynosił aż 40 % (214). Wynikało to głównie z niewystarczającej liczby podanych komórek w przeliczeniu na kg masy ciała biorcy. W związku z tym, pojawiła się pilna potrzeba poszukiwania nowych rozwiązań zwiększających efektywność wykorzystania KP w medycynie transplantacyjnej. Ma to ogromne znacznie nie tylko ze względu na przyszłe pozyskiwanie tego materiału, ale

także ze względu na już zbankowane jednostki KP, które wymagają - ze względów praktycznych oraz etycznych, optymalnego wykorzystania w transplantologii. Stąd też, obecnie **główny nacisk w badaniach nad KP kładzie się na rozwój nowych strategii ekspansji *ex vivo* obecnych w niej komórek HSCs, z jednoczesnym zwiększeniem ich funkcji krwiotwórczych i zdolności do zasiedlania SzK** (Tabela 3).
Starania te rozpoczęły się od prób podawania dorosłym pacjentom nie jednej, lecz **dwóch jednostek KP** jednocześnie, dla zwiększenia liczby przeszczepionych HSCs, która korelowała z prawdopodobieństwem wbudowania się komórek do szpiku biorcy (218, 219). Co ciekawe, badania wykazały, że pomimo podania dwóch jednostek, u większości pacjentów tylko jedna z nich stawała się dominująca i odpowiadała za długoterminową rekonstytucję szpiku (220, 221). Ponadto, zaobserwowano, że taka strategia zazwyczaj nie wiązała się z istotnym przyspieszeniem odbudowy układu krwiotwórczego oraz zwiększała ryzyko wystąpienia GvHD (213, 222).

W toku dalszych prac koncentrowano się na optymalizacji **składu mieszaniny cytokin** i czynników **wzrostowych**, obecnych w pożywce stosowanej do namnażania komórek z KP *ex vivo*. Trzema kluczowymi, powszechnie stosowanymi składnikami niezbędnymi do ekspansji komórek $CD34^+$ okazały się być: czynnik komórek macierzystych (ang. *stem cell factor*; SCF), ligand FMS-podobnej kinazy tyrozynowej 3 (ang. *FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*; FLT3) oraz trombopoetyna (TPO) (223). Kolejne badania zwiększały pulę potencjalnych cząsteczek stymulujących namnażanie komórek z KP w warunkach *ex vivo*, w tym m.in. o erytropoetynę, interleukinę 6, G-CSF oraz czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytarno-makrofagowych (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*; GM-CSF) (164). Wybrane czynniki dodawano do hodowli statycznej lub w trybie ciągłej perfuzji z zastosowaniem bioreaktorów, np. Aastrom Replicell System (213, 224). Jednakże, szczegółowe analizy wykazały, że czynniki te promowały ekspansję głównie komórek progenitorowych, przy jedynie nieznacznym zwiększeniu liczebności komórek LT-HSCs (225). Ponadto, tak namnażane komórki nie wykazywały zwiększonego potencjału repopulacyjnego w porównaniu do komórek z jednostek niepoddanych manipulacjom (226).

Dlatego też, w toku dalszych badań, uzupełniano skład pożywki hodowlanej o inne czynniki, wykazujące działanie modulujące aktywność kluczowych szlaków związanych z procesami proliferacji i różnicowania komórek HSCs. Przykładowo, dodatek Jagged 1 lub Delta 1, będących **ligandami dla receptorów Notch**, skutkował nie tylko ekspansją komórek HSCs *ex vivo*, ale także efektywną repopulacją szpiku *in vivo* (227, 228). Jednakże, w eksperymentach tych wciąż należało wspomagać proliferację komórek mieszaniną cytokin, obserwując jednocześnie trudności w ustaleniu optymalnego stężenia stosowanych ligandów Notch (229). Kolejnym proponowanym podejściem była ekspansja komórek w obecności **prostaglandyny 2E**, wpływającej na szlak sygnałowania Wnt (230, 231) lub użycie białek **z rodziny angiopoetynowo-podobnych** (ang. *angiopoietin-like proteins*), modulujących aktywność czynnika transkrypcyjnego Ikaros, zaangażowanego w regulację hematopoezy (232, 233). Inną molekułą zwiększającą ekspansję komórek $CD34^+$ oraz ich potencjał repopulacyjny jest pochodna puryny- **Stem Regenina 1**, będąca antagonistą arylowego receptora węglowodorowego (ang. *aryl hydrocarbon receptor*;

AhR), biorącego udział w różnicowaniu komórek HSCs (234). Badania wykazały, że wspomniany receptor ulega ekspresji na komórkach HSCs, utrzymując je w stanie nieaktywnym mitotycznie (235). Dlatego też podjęto próby zastosowania Stem Regeniny 1 w praktyce klinicznej (236).

Ponadto, prowadzi się także badania nad wykorzystaniem związków drobnocząsteczkowych, takich jak m.in. inhibitory kinazy p38 MAPK (237, 238) oraz **nikotynamid** - wykazujący właściwości hamujące różnicowanie komórek HSCs przy jednoczesnej stymulacji ich proliferacji związanej z hamowaniem NAD-zależnej deacetylazy histonowej (239-241). Testuje się także **inhibitory deacetylaz histonowych oraz metylotransferaz DNA**, odpowiedzialnych za epigenetyczną regulację ekspresji genów, związaną z remodelingiem struktury chromatyny (242), w tym m.in. **kwas walproinowy** (243), **5-azadeoksycytydynę** (244, 245) oraz **trichostatynę A** (246). Dodatkowo, ze względu na wyniki eksperymentów świadczące o roli wewnątrzkomórkowego stężenia miedzi w regulacji potencjału komórek z KP do różnicowania w kierunku linii hematopoetycznych (247), prowadzi się także badania nad zastosowaniem chelatorów tego pierwiastka (np. **tetraetylenpentaminy**) do ekspansji komórek $CD34^+$, zarówno w badaniach podstawowych (248), przedklinicznych (249), jak i w fazie prób klinicznych (250). Ponadto, podejmuje się także próby zastosowania **systemu ko-kultury komórek HSCs z komórkami stromalnymi** (251).

Należy jednak zaznaczyć, że w przypadku zdecydowanej większości prowadzonych dotąd badań klinicznych, w celu zwiększenia liczby przeszczepianych komórek HSCs podawano pacjentom dwie jednostki KP, w tym jedną natywną oraz drugą, poddaną manipulacji *ex vivo* (Tabela 3). Takie podejście, choć skutkujące obiecującymi rezultatami, w rutynowej praktyce klinicznej mogłoby istotnie ograniczać dostępność materiału przeszczepowego oraz znacząco zawyżać koszty procedur okołoprzeszczepowych. Ponadto, wyniki badań wskazują, że w przypadku około połowy pacjentów wszczepieniu ulega tylko jednostka KP - niepoddana wcześniejszym manipulacjom *ex vivo* (168).

Tabela 3. Zestawienie dotychczasowych strategii ekspansji *ex vivo* komórek $CD34^+$ izolowanych z KP. Zmodyfikowano na podstawie (193).

	Strategia ekspansji	Czas ekspansji	Krotność ekspansji
Mieszaniny cytokin/czynników wzrostu	SCF, FLT3, G-CSF, IL-3, IL-6, BMP-4	3-4 dni	3,2
	SCF, FLT3, G-CSF, IL-3, IL-6, sonic hedgehog	7 dni	200

	Delta1$^{ext\ IgG}$, fibronektyna, SCF, TPO, FLT3, IL-6, IL-7, GM-CSF	16-29 dni	3300
	Delta1$^{ext\ IgG}$, fibronektyna, SCF, TPO, FLT3, IL-3, IL-6	17-21 dni	184
Związki drobnocząsteczkowe	**5-azacytydyna** (+TSA, FBS, SCF, TPO, FLT3, IL-3)	9 dni	5
	StemRegenin1 (+SCF, TPO, FLT3, IL-6)	3 tygodnie	670
	UNC0638 (+SCF, TPO, FLT3, IL-6)	14 dni	60
	NIC (+SCF, TPO, FLT3, IL-6, FBS)	21 dni	700
	UM171 (+SCF, TPO, FLT3)	12 dni	90
Próby kliniczne	**NiCord**$^{++}$ (NIC, SCF, TPO, FLT3, IL-6, FBS) ++	21 dni	72
	StemRegenin 1^{++} (+SCF, TPO, FLT3, IL-6)	15 dni	328
	Kokultura z komórkami MSCs^{++}	14 dni	30
	Aastrom Replicell System^{++} (FBS, surowica końska, PIXY321, FLT3, EPO)	12 dni	0,5
	Chelator miedzi^{++} (+SCF, FLT3, IL-6, TPO)	21 dni	6
	Ligand Notch^{++} (Delta1$^{ext\ IgG}$, SCF, TPO, FLT3 Fibronektyna, , IL-3, IL-6)	16 dni	164

Objaśnienia: $^{++}$ przeszczep dwóch jednostek KP; **BMP-4**- białko morfogenne kości 4 (ang. *bone morphogenetic protein 4*); **Delta1$^{ext\ IgG}$** - białko fuzyjne Delta-1 i końca Fc immunoglobuliny IgG1; **EPO**- erytropoetyna; **FBS**- bydlęca surowica płodowa (ang. *fetal bovine serum*); **FLT3**-ligand FMS-podobnej kinazy tyrozynowej 3 (ang. *FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*); **G-CSF**-czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (ang. *granulocyte colony-stimulating factor*); **GM-CSF**- czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytarno-makrofagowych (ang. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*); **IL**- interleukina; **NIC**- nikotynamid; **PIXY321**- białko fuzyjne GM-CSF/IL-3; **SCF**- czynnik komórek macierzystych (ang. *stem cell factor*); **TPO**- trombopoetyna; **TSA**- trichostatyna; **UM171**- analog Stem Regeniny 1

Innym ważnym aspektem jest fakt, że w przypadku niektórych strategii ekspansji *ex vivo* stosuje się również dodatek płodowej surowicy bydlęcej (ang. *fetal bovine serum*; FBS), co znacznie utrudnia możliwość wykorzystania takiego protokołu w praktyce klinicznej, wymagającej systemów bezsurowiczych i pozbawionych substancji odzwierzęcych. Ponadto, dotychczasowe strategie ekspansji komórek z KP skutkują często nie tylko ich proliferacją, ale jednoczesnym obniżeniem potencjału hematopoetycznego w wyniku różnicowania, przejawiającego się m.in. spadkiem ekspresji markerów „macierzystości', w tym głównie CD34 (252). Ponadto, istnieją przesłanki świadczące o spadku potencjału namnażanych HSCs do odtwarzania układu krwiotwórczego po ich przeszczepieniu (253, 254). Mając powyższe na uwadze, wciąż konieczna jest dalsza optymalizacja strategii namnażania komórek HSCs obecnych w KP, w celu maksymalizacji wykorzystania tego materiału biologicznego w praktyce klinicznej.

Oprócz metod ekspansji komórek HSCs z KP *ex vivo*, nie bez znaczenia pozostają także **próby bezpośredniego zwiększenia efektywności zasiedlania przez te komórki nisz szpikowych i podjęcia procesów hematopoezy po wszczepieniu**. W tym celu podejmuje się m.in. próbę zastosowania **inhibitorów antygenu CD26**, będącego peptydazą dipeptydylową IV (ang. *dipeptidyl-peptidase IV*; DPPIV). Aktywność CD26 skutkuje zmniejszeniem potencjału do chemotaktycznej migracji komórek krwiotwórczych, w wyniku cięcia przez ten enzym N-końca cząsteczki SDF-1. Wykazano, że zastosowanie inhibitorów DPPIV zwiększa zdolność komórek $CD34^+$ z KP do odpowiedzi na gradient SDF-1, przyczyniając się tym samym do nieznacznej poprawy ich wbudowywania po przeszczepie (255-257). Wykazano także, że stymulacja komórek **prostaglandyną 2E** przed przeszczepem zwiększała efektywność zasiedla nisz szpikowych przez komórki HSCs, co może być związane z jej wpływem na wzrost ekspresji receptora CXCR4 oraz ich potencjału migracyjnego *in vitro* (230, 258). Podobne efekty poprawy uzyskuje się też z zastosowaniem **nikotynamidu** (241, 259). Najnowsze prace wskazują także, że czynniki wpływające na aktywację jądrowych receptorów hormonów, takie jak np. **antagonista receptora PPARγ** (z ang. *peroxisome proliferator-activated receptor-γ*) poprawia wbudowanie komórek krwiotwórczych po przeszczepie do myszy z upośledznym układem odporności (260, 261). Ciekawym podejściem jest także poddanie komórek HSCs z KP działaniu fukozylotransferaz, modyfikujących obecne na ich powierzchni ligandy selektynowe.

Wykazano, że zwiększenie **fukozylacji** tych ligandów poprawia interakcję komórek krwiotwórczych ze śródbłonkiem naczyniowym oraz stromą szpiku, przyczyniając się tym samym do zwiększonego wbudowania w szpik po przeszczepie (262, 263).
Warto także zaznaczyć, że odpowiednia **metoda selekcji jednostki KP** może również decydować o efektywności jej przeszczepu. Standardowo wybór ten podyktowany jest liczbą komórek jądrzastych w chwili zamrażania oraz zgodnością antygenów HLA (264). Jednakże, ze względu na fakt, iż przy zastosowaniu takiej strategii odnotowuje się znaczący odsetek niepowodzenia przeszczepu, poszukuje się dodatkowych kryteriów zwiększających szansę na sukces rekonstytucji szpikowej po podaniu KP. Bazują one dziś m.in. na dodatkowej analizie liczby komórek $CD34^+$, potencjale materiału klinicznego w teście CFC czy dodatkowych testach po jego rozmrożeniu, w tym m.in. ocenie żywotności (142, 265-267). Co ciekawe, opracowano nawet system punktacji „*Cord Blood Apgar*", w którym wieloparametrowa analiza pre- i post-mrożeniowa KP zwiększa efektywność właściwego wyboru materiału do przeszczepu (268). Wraz z postępem badań poprawie uległy także kryteria doboru biorców, co pozwoliło realnie zwiększyć szanse na przyjęcie przeszczepu i rekonstytucję układu krwiotwórczego u dorosłych pacjentów (269, 270).

1.3. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe jako nowe narzędzie w naukach biomedycznych

1.3.1. Definicja i klasyfikacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. *extracellular vesicles*; EVs) to heterogenna populacja obłonionych struktur pęcherzykowych, uwalnianych z powierzchni komórek (271). EVs wydzielane są zarówno przez komórki prawidłowe, jak i nowotworowe i apoptotyczne, a ich obecność stwierdzono także m.in. w wielu płynach ustrojowych, w tym w ślinie, moczu, mleku czy płynie owodniowym (272-274).

Obecna klasyfikacja EVs opiera się głównie na ich wielkości oraz przedziale komórkowym, z którego pochodzą, co wpływa również na ich różny skład molekularny (Tabela 4, Rycina 6). Rozróżnia się zasadniczo trzy główne grupy EVs: **egzosomy, ektosomy, czyli mikropęcherzyki oraz ciałka apoptotyczne** (275).
Egzosomy to grupa pęcherzyków o wielkościach wynoszących od ok. 30 nm do 120 nm. Są one wydzielane na drodze egzocytozy, na skutek fuzji „pakietów", które je przenoszą – tzw. ciałek wielopęcherzykowych (ang. *multivesicular bodies*; MVBs) – z błoną komórki. Egzosomy powstają w przedziale późnych endosomów, dzięki czemu wzbogacone są w białka z rodziny tetraspanin (CD9, CD63, CD81), szoku cieplnego (HSP70 oraz HSP90), a także w białka zaangażowane w sort i transport endosomalny, takie jak m.in. TSG100 czy Alix (z ang. *ALG-2 interacting protein X*) (276, 277).

Tabela 4. Zestawienie typów EVs w zależności od ich wielkości, pochodzenia oraz wybranych markerów.

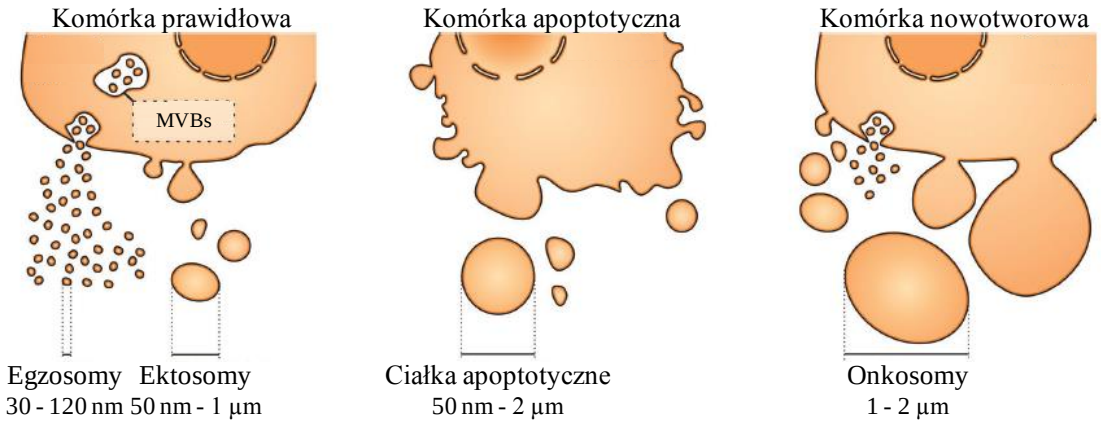
Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs)				
	Egzosomy	**Ektosomy**	**Ciałka apoptotyczne**	**Onkosomy**
Wielkość	30 - 120 nm	50 nm - 1 µm	50 nm - 2 µm	1 - 2 µm
Pochodzenie	Ciałka wielopęche-rzykowe	Uwalnianie z powierzchni błony komórkowej	Fragmentacja obumierających komórek	„Odpączkowywanie" (tzw. *blebbing*) z komórki
Wybrane markery	Tetraspaniny, Alix, TSG101, flotilina-1	selektyny, integryny, CD40L fosfatydylo-seryna, markery komórkowo-specyficzne	białka histonowe, fosfatydylo-seryna	komórkowo-specyficzne markery nowotworowe

Mikropęcherzyki, zwane także ektosomami, posiadają średnicę od 50 nm do 1 µm i są uwalniane z powierzchni komórki na drodze wypuklenia się fragmentu błony z powierzchni komórki prowadzącego do powstania i oderwania się pęcherzyka (z ang. *budding*) w wyniku rozerwania podbłonowego cytoszkieletu. Są one wzbogacone m.in. w selektyny, integryny, CD40L, fosfatydyloserynę oraz szereg innych cząsteczek błonowych charakterysrtycznych dla komórek, z których pochodzą (278).

Ciałka apoptotyczne to pęcherzyki w zakresie średniej wielkości od 50 nm do 2 µm, powstające w wyniku fragmentacji komórki podczas procesu programowanej śmierci (apoptozy). Mechanizm ich powstawania sprawia, że są one wzbogacone w białka histonowe oraz fosfatydyloserynę, a także mogą zawierać fragmenty DNA (279, 280).

Odrębną grupę EVs stanowią także tzw. onkosomy, czyli pęcherzyki wydzielane przez komórki nowotworowe. Cechują je zwykle większe rozmiary (1-10 nm) oraz obecność na ich powierzchni markerów nowotworowych (281, 282). Zaklasyfikować je można jako komórkowo- specyficzną frakcję ektosomów, wydzielaną przez komórki nowotworowe i pełniącą istotną rolę w odziaływaniu z komórkami układu odporności prowadzącym często do jego wyciszenia względem komórek nowotworowych (282).

Ze względu na doniesienia literaturowe świadczące o szczególnym znaczeniu egzosomów oraz mikropęcherzyków w kontekście przenoszenia biologicznie aktywnej zawartości komórek rodzicielskich, dalsza część niniejszej rozprawy będzie koncentrować się na tych dwóch subpopulacjach EVs.



Rycina 6. Klasyfkacja EVs na podstawie ich rozmiaru oraz typu komórki wydzielającej. Zmodyfikowano na podstawie (280).

1.3.2. Zawartość molekularna EVs

Zawartość molekularna EVs jest konsekwencją ich struktury pęcherzykowej, gdzie niewielki fragment cytoplazmy komórki otoczony jest dwuwarstą lipidową błony komórkowej. Zatem, bioaktywny skład EVs warunkowany jest głównie typem komórek, z których pochodzą. Wykazano ponadto, że zawartość ta zależy również od stanu aktywacji komórki (283, 284). Dodatkowo, jak już wspomniano, o biologicznej zawartości pęcherzyków decyduje także ich zaklasyfikowanie do danego typu: ekto-, egzosomalnego lub frakcji ciałek apoptotycznych, co ściśle zależy od mechanizmów ich powstawania w komórce.

W związku z pęcherzykową strukturą, EVs zawierają składową lipidową, będącą głównie częścią błony biologicznej otaczającej część cytoplazmatyczną pęcherzyka. W obrębie części lipidowej odnaleźć można typowe składniki błon komórkowych. Jednakże, wykazano, że błony EVs, w szczególności egzosomów, są szczególnie wzbogacone w cholesterol, sfingomieliny, fosfatydylocholiny oraz fosfatydylo-etanolaminy (285, 286). Co więcej, dane literaturowe wskazują, że taki skład błon egzosomów odgrywa istotną rolę w procesie segregacji pęcherzyków w MVBs (287).
Z kolei, spośród kluczowych bioaktywnych składników części cytoplazmatycznej wyróżnić można dwie podstawowe komponenty, w tym białka oraz kwasy nukleinowe (280). Jak wspomniano, zawartość białkowa EVs wzbogacona jest w białka przedziału endosomalnego komórek, w tym m.in. GTPazy Rab, białka SNARE (ang. *SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) Receptor*) zaangażowane w proces fuzji pęcherzyków z błoną komórkową, aneksyny, flotylliny oraz białka związane z biogenezą EVs (np. Alix, Tsg101) (288). Ponadto, pęcherzyki te wzbogacone są również w białka wchodzące w skład mikrodomen błonowych i tratw lipidowych, do których zaliczyć możemy m.in. tetraspaniny (289).

EVs zawierają także kwasy nukleinowe, w tym w szczególności RNA, występujące głównie w formie informacyjnego RNA (ang. *messenger RNA*; mRNA) oraz miRNA (z ang. *micro RNA*). Warto zaznaczyć, że obecność tego drugiego typu RNA, jako cząsteczek regulatorowych, budzi coraz większe zainteresowanie badaczy, w kontekście potencjalnych bioaktywnych związków odpowiedzialnych za aktwność funkcjonalną EVs. Jednymi z pierwszych doniesień świadczących o występowaniu miRNA w zewnątrzkomórkowych, obłonionych strukturach były prace Valadi et al. oraz Huntera et al. (290, 291), a dalsze badania potwierdziły obecność różnych typów RNA w EVs wydzielanych przez komórki *in vitro* (292, 293) oraz obecnych w płynach ustrojowych (291, 294). Obecnie postuluje się obecność selektywnego mechanizmu sortowania i pakowania wybranych miRNA do EVs, o czym świadczyć mogą liczne prace wykazujące wzbogacenie o pewne miRNA w pęcherzykach, w porównaniu do ich komórek rodzicielskich (283, 295-297). Jednakże, szczegóły dotyczące mechanizmu tej selektywności wciąż nie są znane. Sugeruje się udział w tym procesie m.in. kompleksu RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*), uczestniczącego w wiązaniu miRNA do białek z rodziny *Argonaute* (298). Co ciekawe, badania ostatnich lat wskazują, że oprócz mRNA i miRNA, EVs zawierać mogą także inne rodzaje niekodującego RNA, w tym transportujący RNA (z ang. *transporting RNA;* tRNA), mały interferujący RNA (z ang. *small interfering RNA;* siRNA) czy vRNA (z ang. *vault RNA*) (299, 300). Jednakże, przy krytycznej interpretacji wyników dotyczących zawartości biologicznej pęcherzyków należy uwzględnić ryzyko obecności zewnątrzkomórkowych, tj. niezwiązanych z EVs, kompleksów białkowo-rybonukleinowych, które mogą ulegać ko-izolacji podczas przygotowywania preparatów frakcji pęcherzykowych (275).

Obecnie zidentyfikowano ok. 2500 cząsteczek RNA oraz ponad 4000 różnych białek występujących w EVs, które odnaleźć można w bazie danych ExoCarta (301). Najnowsze badania wskazują także na obecność genomowego DNA w EVs, które umożliwiają jego horyzontalny transfer pomiędzy komórkami, skutkujący zmianą ekspresji genów, a co za tym idzie cech biologicznych komórek (302-304). Przykładowo, zidentyfikowano niemal 350 chromosomowych sekwencji DNA w pęcherzykach produkowanych przez kardiomiocyty (303). W innym badaniu wykryto obecność zamplifikowanych sekwencji onkogenu c-Myc w EVs z komórek rdzeniaka zarodkowego (305). Ponadto, wykazano także obecność mitochondrialnego DNA w próbkach pęcherzyków z linii komórek mioblastycznych, astrocytów oraz komórek glejaka (306, 307). Podobnie jak w przypadku innych składników EVs, stwierdzono również pewną selektywność występowania cząsteczek DNA, wynikającą zarówno z typu pęcherzyków, jak i stanu aktywacji wydzielających je komórek (308, 309).

Z funkcjonalnego punktu widzenia, bogaty skład molekularny EVs może być przenoszony z komórek produkujących pęcherzyki do innych komórek docelowych, wpływając na ich status funkcjonalny, co może być potencjalnie wykorzystywane w celu modulacji funkcji różnych komórek w warunkach zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*.

1.3.3. Biogeneza i mechanizm wydzielania EVs

Jak już wspomniano wyżej, mechanizm powstawania i wydzielania poszczególnych frakcji EVs jest różny. Egzosomy początkowo formowane są w MVBs, których zawartość może ulegać degradacji po połączeniu się z lizosomami lub może ulec sekrecji na drodze egzocytozy. O dwukierunkowym losie MVBs decyduje m.in. ich zawartość lipidowa, przy czym wykazano, że populacje MVBs bogate w cholesterol są kierowane na drogę sekrecji (310), a wzbogacone o kwas lizobisfosfatydowy łączą się z lizosomami i są kierowane na drogę degradacji (311). Tworzenie MVBs obejmuje segregację ich zawartości przy błonie ograniczającej endosomu, a następnie wpuklania się pęcherzyków do jego wnętrza. W proces ten zaangażowane są kompleksy ESCRT (z ang. *endosomal sorting complex responsible for transport*), asocjujące z białkami Alix oraz syntenią (312, 313). Jednakże, niektóre prace sugerują, że formowanie się MVBs może zachodzić także na drodze niezależnej od kompleksów ESCRT, przy jednoczesnym zaangażowaniu sfingomielinaz, wzbogacających egzosomy w ceramidy (287, 314, 315). Wykazano także udział m.in. białek szoku cieplnego oraz tetraspanin w procesie formowania egzosomów (275). Warto zauważyć, że zaangażowanie wymienionych powyżej białek w procesie biogenezy egzosomów czyni je tym samym markerami tej populacji pęcherzyków.

W przypadku ektosomów, mechanizm ich tworzenia jest mniej poznany. Niemniej jednak wykazano, że ich formowaniu towarzyszy oligomeryzacja białek cytoplazmatycznych i ich kotwiczenie w błonie komórkowej na drodze mirystoilacji oraz palmitoilacji (316-318). Udowodniono także udział cytoszkieletu aktynowego oraz białek z rodziny GTPaz w procesie tworzenia ektosomów (318).

Podobnie jak w przypadku biogenezy, również dokładny przebieg samego procesu uwalniania EVs z powierzchni komórek wciąż jest nieznany, jednak wiadomym jest, że wymaga on reorganizacji cytoszkieletu podbłonowego, GTPaz Rab oraz białek SNARE odpowiedzialnych za fuzję pęcherzyków z błoną komórkową (319-321). Ponadto, możliwa jest zewnętrzna stymulacja komórek do wydzielania EVs, np. poprzez depolaryzację błony w przypadku neuronów (322), aktywację receptora trombiny w przypadku płytek krwi (323), indukcję wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowych jonów wapnia (324) czy wreszcie stymulację komórek, np. komórek dendrytycznych za pomocą lipopolisacharydów (325).

1.3.4. Metody izolacji EVs

EVs jako pęcherzyki wydzielane przez komórki do środowiska zewnętrznego, w tym do pożywki hodowlanej w warunkach *in vitro*, a także do przestrzeni międzykomórkowej lub płynów ustrojowych *in vivo*, mogą być relatywnie łatwo izolowane do dalszych analiz bez konieczności przerywania integralności produkujących je komórek.

Najbardziej klasyczną metodą ich izolacji jest sekwencyjne wirowanie pożywki hodowlanej lub płynów ustrojowych, w których znajdują się EVs (326). Początkowe etapy wirowania mają na celu usunięcie z materiału (np. pożywki) komórek, ich szczątków oraz większych ciałek apoptotycznych. Kolejnym krokiem jest ultrawirowanie przy min. 100 000 x *g*, którego efektem jest powstanie osadu, który zawiera frakcje zarówno ektosomów, jak i egzosomów. Osad wzbogacony w EVs, po dodatkowym odpłukaniu potencjalnych zanieczyszczeń, przechowuje się następnie do dalszych analiz (327). Warto jednak zaznaczyć, że opisana metoda izolacji, którą dziś najczęściej się stosuje, skutkuje otrzymaniem heterogennej mieszaniny różnych subpopulacji pęcherzyków, z jednoczesnym ryzykiem obecności zanieczyszczeń w postaci m.in. agregatów białkowych (328, 329). Dlatego też, w ostatnich latach nastąpił intensywny rozwój nowych technik izolacji oraz oczyszczania próbek EVs. Modyfikuje się zarówno metodę sekwencyjnego wirowania, zmieniając parametry poszczególnych jego etapów, jak i optymalizuje się nowe techniki, w tym m.in. wirowanie w gradiencie sacharozy lub jodiksanolu (tzw. *OptiPrepu*), które wykorzystują subtelne różnice w gęstości poszczególnych frakcji (330). Stosuje się także metody kolumnowe, precypitacyjne, chromatograficzne, systemy do filtracji oraz komercyjnie dostępne zestawy do izolacji, oparte o strącanie EVs w glikolu polietylenowym (328, 331-333). Ponadto, niektóre grupy badawcze stosują systemy bazujące na izolacji poszczególnych populacji EVs w oparciu o kulki magnetyczne opłaszczone specyficznymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko antygenom stanowiącym markery poszczególnych typów pęcherzyków (334, 335). Jednakże, mimo szeregu rozwijający się obecnie metod izolacji EVs, wciąż najczęściej stosowanym i najlepiej wystandaryzowanym podejściem pozostaje metoda sekwencyjnego wirowania z etapem ultrawirowania.

1.3.5. EVs jako parakrynne czynniki wymiany informacji

Do niedawna EVs postrzegane były jako zanieczyszczenia pozbawione zasadniczej funkcji biologicznej. Jednakże, rosnąca liczba doniesień naukowych potwierdza fakt, że pełnią one istotną rolę jako element aktywności parakrynnej komórek, biorąc udział w procesach komunikacji między komórkami oraz uczestnicząc w horyzontalnym transferze cząstek biologicznych (272, 293).

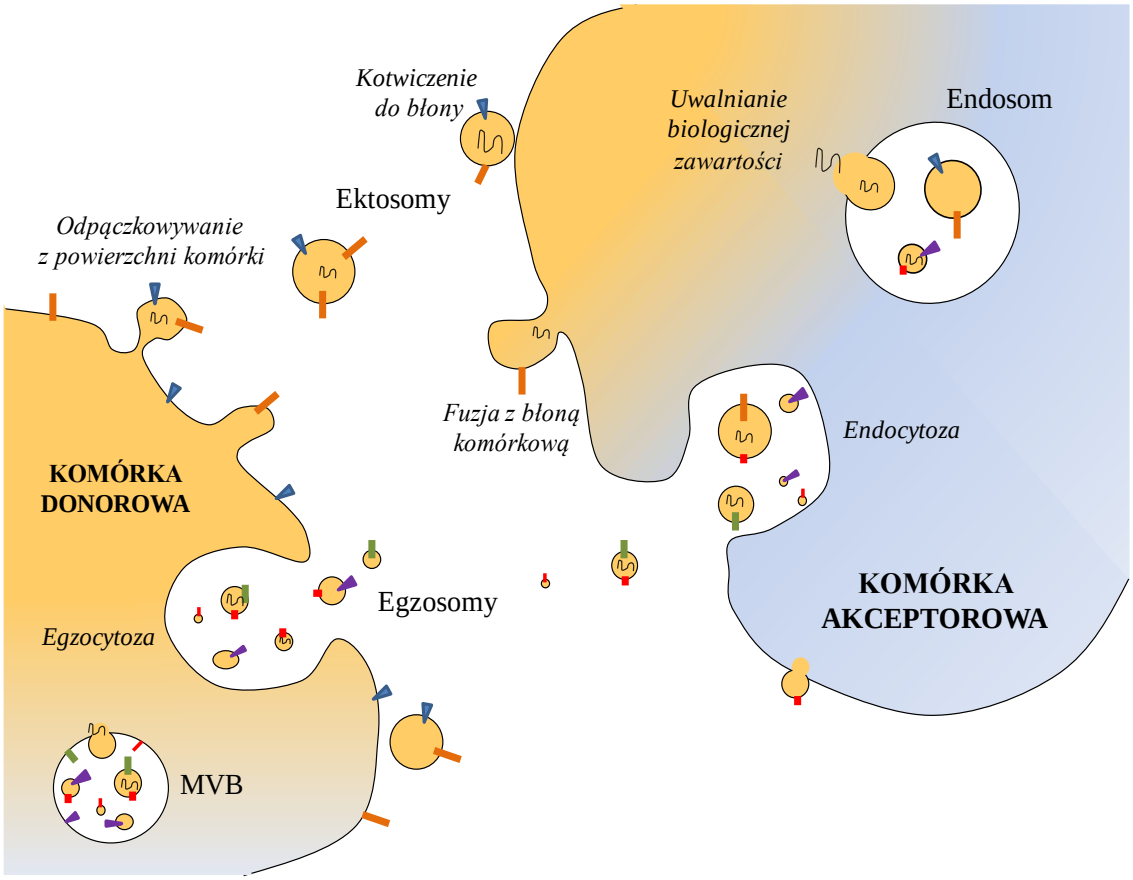
Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe mogą łączyć się z komórkami docelowymi na kilka sposobów: na drodze ich endocytozy, fagocytozy lub poprzez bezpośrednią fuzję z błoną komórkową, mogącą także zachodzić na drodze interakcji receptor-ligand (280, 336). Mechanizm wiązania pęcherzyków do błony komórkowej wciąż nie jest szczegółowo zbadany, choć postuluje się udział w tym procesie m.in. białek z grupy syncytyn, które wiążą się do receptorów MFSD2a (z ang. *major facilitator superfamily domain 2a*) obecnych w błonie komórki (336). Istotną rolę odgrywają także molekuły adhezyjne, w tym integryny, oraz inne cząsteczki uczestniczące w specyficznych wiązaniach typu receptor-ligand, obecne na powierzchni EVs (336). Zastosowanie znaczników fluorescencyjnych wykazało, że internalizacja EVs do wnętrza komórek

może być obserwowana już po 30 minutach od ich podania, a sygnał fluorescencji od wyznakowanych pęcherzyków utrzymuje się przez kilka, a nawet kilkadziesiąt godzin (280). Co ciekawe, wykazano także pewną selektywność pęcherzyków w wiązaniu się do określonych typów komórek docelowych. Dla przykładu wykazano, że EVs pochodzące z płytek krwi wiązały się do komórek śródbłonka naczyń oraz makrofagów, ale nie do neutrofili (337). Z kolei egzosomy wydzielane przez komórki nerwiaka zarodkowego wykazywały powinowactwo do neuronów i komórek glejowych, natomiast pęcherzyki pochodzące ze stymulowanych neuronów kory mózgu były endocytowane jedynie przez neurony (338). Jednym z postulowanych mechanizmów regulujących selektywność interakcji z danym typem komórki jest wpływ tetraspanin obecnych na EVs, które oddziałują z integrynami i innymi białkami kotwiczącymi, modulując tym samym ich funkcje (339). Ponadto, w regulacji specyficzności interakcji EVs z komórkami docelowymi mogą również brać udział oddziaływania typu ligad-receptor. Przykładowo wykazano, że EVs wydzielane przez progenitory komórek śródbłonka wiążą się za pomocą receptora CXCR4 do jego liganda- SDF-1, obecnego na komórkach endotelialnych (340).
Po związaniu się z komórką, EVs mogą pozostać bardziej lub mniej stabilnie zasocjowane z błoną komórkową, szczególnie w przypadku komórek o niskiej aktywności endocytarnej (341), zostać zinternalizowane lub ulegać fuzji z komórką docelową (283, 342) (Rycina 7).

Fakt wydzielania pęcherzyków przez komórki prawidłowe oraz nowotworowe nasuwa pytania dotyczące pełnionych przez nie funkcji biologicznych, zarówno w warunkach homeostazy organizmu, jak i w patogenezie chorób (Rycina 7). Wiedza naukowców, dotycząca znaczenia EVs w procesie wymiany informacji między komórkami jest wciąż poszerzana i uzupełniana nowymi badaniami. Niemniej jednak, wiadomym jest, że EVs mogą służyć m.in. jako cząstki modulujące funkcje komórek układu odpornościowego (343), przy czym w zależności od badanego układu wykazano zarówno ich efekt aktywujący (344), jak i hamujący (345). Wykazano m.in., że EVs wydzielane przez komórki układu odpornościowego mogą przenosić na swojej powierzchni m.in. ligand Fas, biorąc tym samym udział w kontroli śmierci komórkowej podczas odpowiedzi immunologicznej (346, 347). Mogą one także pełnić rolę pęcherzyków prezentujących antygeny, stymulując tym samym odpowiedź przeciwnowotworową (348). Wykazano także obecność molekuł ko-stymulujących (np. CD54, CD80) na egzosomach wydzielanych przez komórki prezentujące antygen (334, 349).

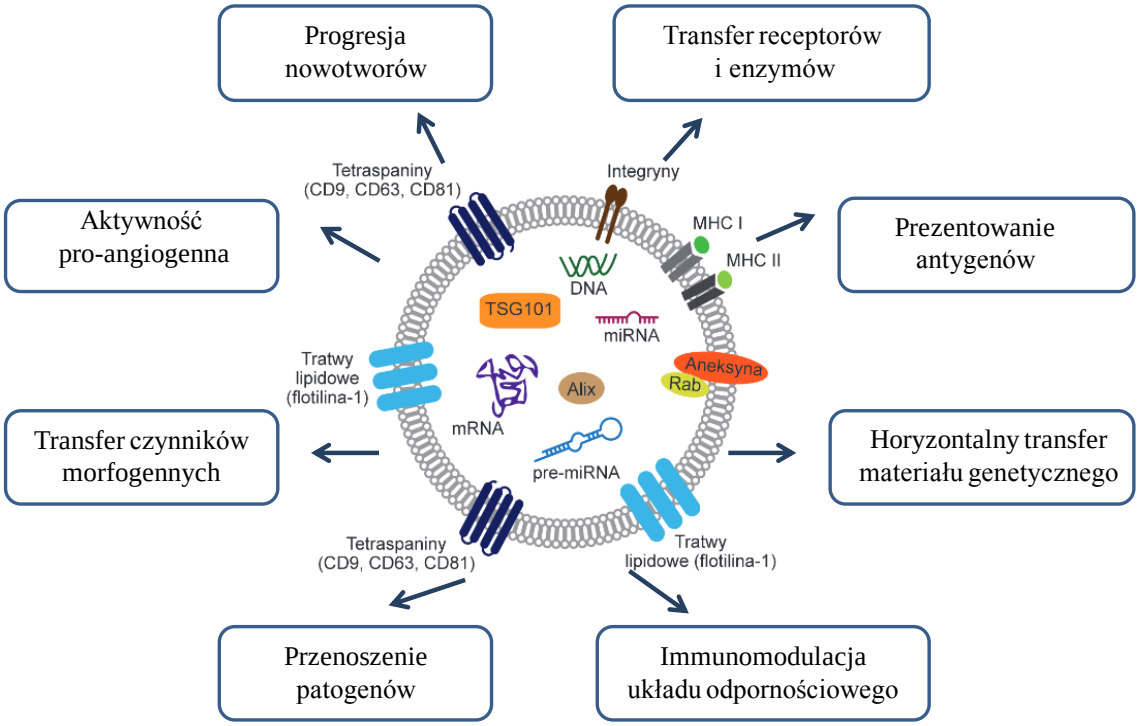
Z drugiej jednak strony, EVs wydzielane przez nowotwory mogą promować ich progresję, działając pro-angiogennie oraz hamująco na układ immunologiczny (350, 351). Co ciekawe, udział EVs w patogenezie nowotworów został także potwierdzony w przypadku tych związanych z układem hematopoetycznym (352). Obecność EVs o aktywności immunomodulacyjnej wykazano także w wielu innych układach, w tym w drogach oddechowych (353), jelitach (354) oraz w ludzkim mleku (355). Badania wskazują także, że pęcherzyki pochodzące ze szpikowych komórek mezenchymalnych mogą także wyciszać stan zapalny (284).

Ponadto, EVs mogą parakrynnie wpływać na komórki docelowe poprzez przenoszenie do nich swojej bioaktywnej zawartości, w tym receptorów, aktywnych enzymów, a nawet czynników morfogennych, w tym np. białek sygnałowania Wnt (356) oraz Notch (357). Z kolei, w układzie nerwowym pęcherzyki mogą pośredniczyć w regulacji tworzenia mieliny (358) oraz cytoprotekcji neuronów (359).



Rycina 7. Mechanizm sekrecji EVs i ich interakcji z komórkami akceptorowymi.

Warto także zaznaczyć, że oprócz pozytywnego wpływu EVs, związanego z ich właściwościami regulatorowymi oraz regeneracyjnymi, mogą one także uczestniczyć w patogenezie wielu chorób. Oprócz wspomnianej możliwości promowania rozwoju niektórych nowotworów, wykazano także udział EVs w przenoszeniu prionów (360), α-synukleiny odpowiedzialnej za patogenezę choroby Parkinsona (361) oraz β-amyloidu, który przyczynia się do rozwoju choroby Alzheimera (362). Ponadto, EVs mogą przenosić między komórkami cechę lekooporności, co związane jest m.in. z transferem pomp błonowych (ang. *drug-efflux pumps*), biorących udział w aktywnym usuwaniu cząsteczek leków z komórek (363, 364).



Rycina 8. Schemat budowy EVs oraz ich udział w regulacji procesów biologicznych. Zmodyfikowano na podstawie (365).

1.3.6. Możliwości zastosowania EVs w naukach biomedycznych

Zdolność EVs do przenoszenia aktywnych biologicznie cząstek pomiędzy komórkami sprawia, że wzrasta zainteresowanie nimi pod kątem możliwości ich zastosowań w naukach biomedycznych. Jednym z przykładów są próby wykorzystania EVs jako biologicznych nanocząstek do przenoszenia i dostarczania leków oraz innych aktywnych biologicznie cząstek (366). Co ciekawe, autorzy prac badawczych wykazali, że takie EVs są pobierane przez komórki akceptorowe w większym stopniu, niż w przypadku zastosowania liposomów, przy jednoczesnej wysokiej wydajności „naładowania" pęcherzyków odpowiednimi bioaktywnymi cząsteczkami (367). Co szczególnie istotne, wykazano również, że EVs zdolne są do dostarczenia siRNA do mózgu myszy *in vivo*, co otwiera nowe możliwości pokonywania bariery krew-mózg dla cząstek przenoszących leki, stanowiącej istotny czynnik limitujący skuteczność terapii chorób neurologicznych (368).

Z uwagi na fakt, że zawartość biologiczna EVs jest odzwierciedleniem typu oraz stanu aktywacji wydzielających je komórek, w tym także komórek nowotworowych, rośnie również zainteresowanie badaczy wykorzystaniem EVs jako biomarkerów (369). Przykładowo, wykazano, że profil miRNA w EVs krążących we krwi u pacjentek z rakiem jajnika jest dobrym markerem diagnostycznym progresji tej choroby (370). Podobnie, poziom miR145 w egzosomach izolowanych z moczu korelował ze stopniem rozwoju raka prostaty (371). Ponadto, udowodniono także, że skład jakościowy obecnych w krwiobiegu EVs wydzielanych przez komórki śródbłonka oraz płytki krwi

może również służyć jako potencjalny biomarker cukrzycy typu I oraz II, a także towarzyszących jej powikłań (372).
Preparaty zawierające EVs próbuje się także wykorzystywać jako szczepionki antynowotworowe. Wykorzystuje się w tym celu zarówno onkosomy, jak i fakt, że EVs wydzielane przez komórki prezentujące antygen zawierać mogą funkcjonalne antygeny głównego układu zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*; MHC) klasy I i II oraz cząsteczki ko-stymulatorowe, zdolne do aktywacji odpowiedzi przeciwnowotworowej cytotoksycznych limfocytów T (373, 374).

Dodatkowo zainteresowanie badaczy koncentruje się wokół zastosowania EVs jako nowych narzędzi w regeneracji tkanek, opierającej się dotychczas m.in. na terapii z wykorzystaniem całych komórek, w tym komórek macierzystych. Przez wiele lat dominował pogląd, że aktywność regeneracyjna KM bazuje głównie na ich zdolności do bezpośredniej odbudowy uszkodzonej tkanki w wyniku ich różnicowania w komórki, które zostały utracone. Jednakże, ostatnie lata badań jednoznacznie wskazują, że część obserwowanych efektów terapeutycznych po podaniu komórek macierzystych wynika z ich aktywności parakrynnej, związanej z wydzielaniem przez nie szeregu cytokin i czynników wzrostowych, które stymulują komórki rezydujące w miejscu uszkodzenia do podjęcia procesów naprawczych (375). Rosnąca liczba doniesień wskazuje, że KM obok cząsteczek rozpuszczalnych, uwalniają również EVs, które mogą odgrywać kluczową rolę w obserwowanych mechanizmach regeneracyjnych (376).

Zatem, rosnące nadzieje niesie potencjalna możliwość zastosowania EVs jako alternatywy dla terapii komórkowej (377). Co istotne, podanie EVs minimalizuje ryzyko wystąpienia u pacjenta nowotworu powstałego z przeszczepionych całych komórek, w szczególności KM pluripotencjalnych. Ponadto, badania na zwierzętach wykazały potencjalną możliwość podawania preparatów zawierających EVs także w formie aerozoli, co umożliwia ich lokalne podanie do układu oddechowego (dotchawiczo) lub centralnego układu nerwowego (donosowo) (378-380). Zademonstrowano również, że EVs izolowane z niestymulowanych zapalnie komórek MSCs nie posiadają na swojej powierzchni antygenów MHC klasy I i II, co minimalizuje problem zgodności tkankowej w przypadku ich przeszczepów ze źródeł allogenicznych (381).

Ze względu na fakt, że KM mezenchymalne są główną populacją KM wykorzystywaną obecnie w praktyce klinicznej, naturalną konsekwencją tego faktu jest szczególne zainteresowanie badaczy możliwościami aplikacji wydzielanych przez te komórki pęcherzyków (377). Liczne prace wskazują, że EVs izolowane zarówno ze szpikowych MSCs, jak i MSCs z galarety Wharton'a sznura pępowinowego, posiadają istotny potencjał regeneracyjny oraz cytoprotekcyjny (301). Wykazano m.in., że hamują one uszkodzenie narządowe w mysim oraz szczurzym modelu ostrego uszkodzenia nerek (ang. *acute kidney injury*; AKI) (381-384). Ponadto, wykazano ich cytoprotekcyjny oraz pro-angiogenny wpływ w mysim (385) oraz szczurzym modelu

zawału serca (386). Pro-angiogenny efekt EVs z komórek MSCs sznura pępowinowego hodowanych w warunkach hipoksji wykazano także w modelu niedotlenienia kończyny u szczurów (387). Ponadto, właściwości protekcyjne lub regeneracyjne EVs zaobserwowano również w przypadku modeli nadciśnienia płucnego (388), zapalenia jelita grubego (389) oraz uszkodzenia niedotlennego mózgu (390).

W badaniach testuje się również EVs wydzielane przez inne typy KM, w tym m.in. komórki embrionalne (391) oraz komórki iPS. Przykładowo, w przypadku tych drugich, wykazano efekt regeneracyjny w szczurzym modelu idiopatycznego zwłóknienia płuc (392) i radiacyjnego uszkodzenia skóry (393) oraz cytoprotekcję w mysim modelu niedotlenienia/reperfuzji (394). Również prace naszego zespołu świadczą o regeneracyjnym potencjale EVs wydzielanych zarówno przez mysie, jak i ludzkie komórki iPS w kontekście leczenia chorób układu krążenia (395, 396). Co istotne, komórki iPS są także wykorzystywane do różnicowania w inne typy komórek, stanowiące źródło EVs do celów regeneracyjnych (397-399).

Obiecujące wyniki badań przedklinicznych stały się podstawą do prób zastosowania preparatów zawierających EVs także w praktyce medycznej. Obecnie na świecie prowadzonych jest kilkanaście prób klinicznych z zastosowaniem autologicznych oraz allogenicznych preparatów EVs izolowanych m.in. z KM mezenchymalnych oraz komórek dendrytycznych (301, 366). Próby te obejmują leczenie głównie chorób nowotworowych oraz wykorzystują właściwości immunomodulacyjne EVs (343). Dla przykładu, egzosomy izolowane z komórek MSCs zostały użyte w leczeniu pacjentów cierpiących na GvHD (400). Co ważne, w większości przeprowadzonych badań nie zaobserwowano znaczących skutków ubocznych podania preparatów EVs, co czyni je intersującą alternatywą terapeutyczną (366).

Jednakże próby wykorzystania EVs z komórek macierzystych celem zwiększenia regeneracji układu krwiotwórczego są na wczesnym etapie, natomiast badania bazujące na wykorzystaniu pęcherzyków z komórek iPS nie były dotąd prowadzone. Stanowi to zatem nowe, interesujące pole badań oraz potencjalnych zastosowań dla EVs.

2. CELE PRACY

Ludzka KP jako dostępne źródło do pozyskania komórek HSCs, cechujących się dodatkowo niską immunogennością, jest materiałem biologicznym o zastosowaniu klinicznym, stanowiąc istotną alternatywę dla przeszczepu komórek SzK. Jednakże, szersze możliwości wykorzystania komórek HSCs z KP w leczeniu chorób u dorosłych pacjentów wciąż są ograniczone niewystarczającą liczbą przeszczepianych komórek, wynikającą z limitowanej objętości pobranego materiału. W konsekwencji, fakt ten prowadzić może do opóźnionej rekonstytucji układu hematopoetycznego, a nawet niepowodzenia przeszczepu. Zatem, istnieje wciąż potrzeba badań nad poszukiwaniem nowych strategii zwiększających potencjał regeneracyjny komórek z KP. Szczególna uwaga kierowana jest na wykorzystanie różnorodnych czynników parakrynnych, w tym w szczególności EVs, mogących wpływać na funkcje komórek docelowych.

W związku z powyższym, **celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie wpływu hiPS-EVs na właściwości biologiczne i potencjał hematopoetyczny komórek HSCs z KP, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*.**

W toku prowadzonych badań wyodrębniono i realizowano następujące cele szczegółowe:

Cel szczegółowy nr 1: Analiza wpływu hiPS-EVs na tempo ekspansji *ex vivo* oraz aktywność metaboliczną populacji komórek $CD34^+$ izolowanych z KP, wzbogaconej w komórki HSCs;

Cel szczegółowy nr 2: Zbadanie wpływu hiPS-EVs na potencjał hematopoetyczny komórek $CD34^+$ *in vitro*, w tym w szczególności na ich zdolność do różnicowania w kierunku poszczególnych linii komórek krwi oraz tworzenia kolonii hematopoetycznych;

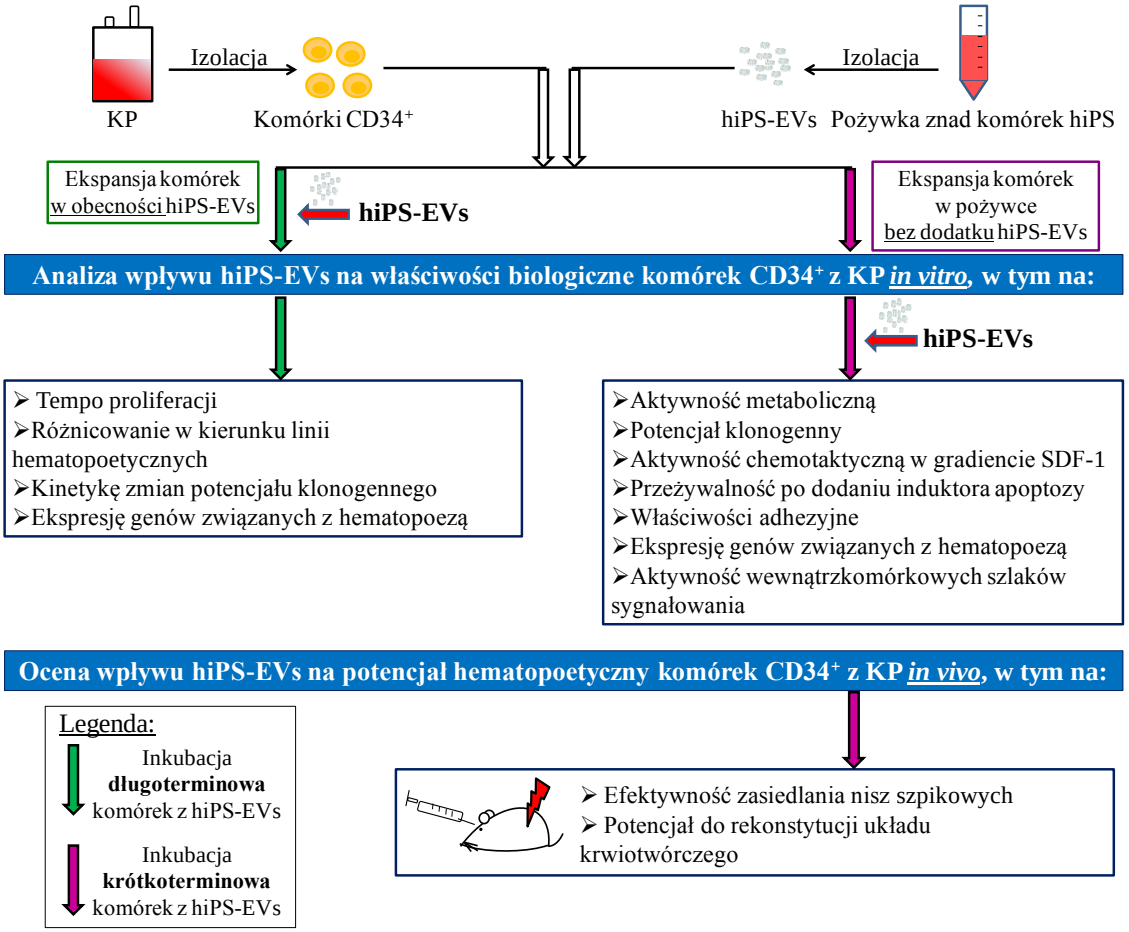
Cel szczegółowy nr 3: Ocena wpływu hiPS-EVs na właściwości adhezyjne i aktywność chemotaktyczną komórek z KP w gradiencie SDF-1 oraz na przeżywalność tych komórek w warunkach cytotoksycznych *in vitro;*

Cel szczegółowy nr 4: Analiza zmian ekspresji wybranych genów oraz aktywności białek zaangażowanych w regulację cech biologicznych i funkcjonalnych komórek $CD34^+$ z KP po ich inkubacji z hiPS-EVs *in vitro;*

Cel szczegółowy nr 5: Ocena wpływu hiPS-EVs na efektywność zasiedlania nisz hematopoetycznych oraz rekonstytucji układu krwiotwórczego przez komórki $CD34^+$ z KP *in vivo,* w mysim modelu radiacyjnego uszkodzenia SzK.

Cele szczegółowe realizowano stosując system długoterminowej lub krótkoterminowej inkubacji komórek CD34$^+$ z hiPS-EVs. W przypadku inkubacji długoterminowej, komórki CD34$^+$ bezpośrednio po izolacji z KP poddawano 14-dniowej ekspansji *ex vivo* w pożywce z dodatkiem hiPS-EVs. W systemie inkubacji krótkoterminowej, komórki CD34$^+$ najpierw namnażano przez 7 dni w pożywce bez hiPS-EVs, a następnie dodawano pęcherzyki do hodowli na czas od 2 do 48 godz., w zależności od rodzaju przeprowadzanego testu.

Podsumowanie przeprowadzonych działań związanych z realizacją celów pracy zestawiono na Rycinie 9.



Ryc. 9. Schemat podsumowujący działania badawcze realizowane w pracy.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Użyte programy komputerowe

7500 Fast System SDS Software (*Thermo Fisher Scientific*) – oprogramowanie do zbierania i analizy danych reakcji PCR w czasie rzeczywistym, prowadzonej przez urządzenie 7500 Fast System

Apogee Histogram wer.3.1 (*Apogee Flow Systems*) – oprogramowanie do zbierania i analizy danych cytometrycznych z cytometru przepływowego Apogee A50-Micro

EndNote X8 (*Clarivate Analytics*) – program do gromadzenia opisów bibliograficznych, a następnie wykorzystywania ich do tworzenia przypisów oraz bibliografii

FACSDiva Software wer. 8.1 (*BD Biosciences*) – oprogramowanie do zbierania i analizy danych z cytometru przepływowego BD LSRFortessa oraz sortera komórkowego BD FACSAria III

GraphPad Prism wer.7 (*GraphPad Software*) – program umożliwiający przeprowadzanie obliczeń i przygotowanie wykresów z danymi eksperymentalnymi

i-control (*Tecan*) – program sterujący do czytnika płytek Infinite M200 Pro analyzer

IDEAS (*Amnis Corp.*) – oprogramowanie służące do analizy danych cytometrycznych uzyskanych za pomocą cytometru obrazowego ImageStream X MkII

Image Lab wer. 5.2.1 (*Bio-Rad*) – program do rejestracji oraz analizy obrazów żeli i blotów, otrzymywanych z czytnika Gel Doc XR+ Gel Documentation System

ISX (*Amnis Corp.*) – oprogramowanie sterujące do zbierania próbek za pomocą cytometru obrazowego ImageStream X MkII

Leica Application Suite X Advanced Fluorescence Software (*Leica Microsystems*) – oprogramowanie do kontroli i analizy danych z mikroskopu fluorescencyjnego Leica DMI6000B

Microsoft Office (*Microsoft Corp.*) – pakiet programów służący do prowadzenia obliczeń, edycji tekstu oraz tworzenia grafiki

NTA wer. 3.2 (*Malvern*) – oprogramowanie służące do zbierania i analizy danych z systemu NanoSight NS300

QuantStudio Software (*Thermo Fisher Scientific*) – oprogramowanie do zbierania i analizy danych reakcji PCR w czasie rzeczywistym, prowadzonej przez urządzenie QuantStudio 6 Flex

Quantity One (*Bio-Rad*) – oprogramowanie służące do densytometrycznej analizy sygnału z membran oraz żeli

Statistica wer.13 (*Stat Soft*) – program umożliwiający przeprowadzanie zaawansowanych analiz statystycznych

3.2. Metody

3.2.1. Izolacja komórek $CD34^+$ z KP

3.2.1.1. Jednostki KP

Jednostki KP pozyskiwane były w ramach współpracy badawczej z Polskim Bankiem Komórek Macierzystych S.A. (PBKM S.A.) w Warszawie, zgodnie ze stosownymi zgodami posiadanymi przez tą instytucję. KP była pobierana przy porodzie dzieci obojga płci, od zdrowych matek, przy czym poród odbywał się zarówno siłami natury, jak i poprzez cesarskie cięcie. Każdorazowo, rodzice noworodka podpisywali zgodę na pobranie materiału do celów naukowych, a sama procedura wykonywana była przez przeszkolony personel medyczny i nie stanowiła zagrożenia dla matki oraz dziecka.
Krew pobierana była za pomocą specjalnego zestawu pobraniowego ze sznura pępowinowego - do jałowych, jednorazowych worków kolekcyjnych (*Ravimed*), zawierających 29 ml roztworu antykoagulanta CPD (z ang. *citrate phosphate dextrose*), którego skład zamieszczono w Tabeli 5. Worki kolekcyjne były następnie umieszczane w dedykowanych zestawach transportowych, przystosowanych do transportu KP i jej bezpiecznego przechowywania do 72 godz. od pobrania.

Tabela 5. Skład płynu antykoagulacyjnego typu CPD, obecnego w workach kolekcyjnych stosowanych przy pobieraniu KP.

Odczynnik	Stężenie [g/l]
Cytrynian sodu dwuwodny	26,30
Glukoza	2,2
Kwas cytrynowy jednowodny	3,2
Dwufosforan sodowy jednowodny	2,2
Woda do wstrzykiwań	-

3.2.1.2. Liza erytrocytów

Jednostki KP po ich dostarczeniu do Zakładu Biologii Komórki WBBiB UJ poddawano lizie w celu usunięcia erytrocytów, których obecność utrudniałaby dalszą preparatykę materiału. W tym celu krew była przenoszona z worków kolekcyjnych do probówek 50 ml typu falkon (*Sarstedt*). Następnie, każdą z probówek zawierającą po 15 ml krwi uzupełniano 30 ml hipotonicznego buforu lizującego BD Pharm Lyse (*BD Pharmingen*), dedykowanego do lizy czerwonych krwinek jako komórek bezjądrzastych, bez naruszania integralności komórek jądrzastych. Przed użyciem, bufor ten rozcieńczano 10-krotnie w wodzie dedykowanej do hodowli komórkowych (*Lonza*). Następnie, krew inkubowano w buforze lizującym przez 15 min w temperaturze pokojowej (TP), po czym odwirowywano (350 x *g*, 10 min, TP). Nadsącz po wirowaniu lizatu usuwano, a osad zawierający komórki jądrzaste oraz resztkę niezlizowanych erytrocytów lizowano ponownie w sposób analogiczny do pierwszej lizy, skracając czas inkubacji w buforze do 10 min. Probówki po drugiej lizie wirowano (350 x *g*, 10 min, TP), zlewano nadsącz, a osad zawierający komórki jądrzaste płukano w celu pozbycia się resztek buforu lizującego, rozpipetowując go w 3 ml buforowanego fosforanem roztworu soli fizjologicznej bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} (ang. *phosphate buffered saline*; PBS; *Lonza*), po czym dopełniając do objętości 45 ml i ponownie wirując (350 x *g*, 10 min, TP).

3.2.1.3. Separacja magnetyczna komórek z KP

W celu wstępnego oczyszczenia komórek HSCs, po odwirowaniu komórek jądrzastych w PBS i zlaniu nadsączu, komórki znakowano do separacji magnetycznej (ang. *magnetic-activated cell sorting*; MACS) za pomocą zestawu CD34 MicroBead Kit Human (*Miltenyi Biotec*), zgodnie z zaleceniami producenta. W skrócie, osad komórkowy zawieszano w buforze do barwienia MACS (300 µl buforu/10^8 komórek), którego skład opisano w Tabeli 6. Następnie dodawano kolejno dwa odczynniki: FcR Blocking Reagent oraz CD34 MicroBeads (po 200 µl/10^8 komórek). Pierwszy z odczynników blokuje receptory dla końców Fc przeciwciał, obecne na części komórek krwi (np. na granulocytach), uniemożliwiając tym samym niespecyficzny wychwyt przeciwciał wiążących się do antygenu CD34. Przeciwciała te, sprzężone z kulkami magnetycznymi, obecne są w odczynniku CD34 MicroBeads.

Zawiesinę komórkową inkubowano z dodanymi odczynnikami przez 30 min w 4° C, po czym dopełniano PBS i wirowano (300 x *g*, 10 min, 4°C). Komórki ponownie zawieszano w buforze MACS (300 µl buforu/10^8 komórek), przenoszono do okrągłodennych probówek cytometrycznych wykonanych z polistyrenu (*Corning*), a następnie sortowano na frakcję pozytywną oraz negatywną za pomocą sortera magnetycznego autoMACS Pro Separator (*Miltenyi Biotec*), z zastosowaniem programu Possel_s.

Tabela 6. Skład buforu MACS stosowanego podczas znakowania immunomagnetycznego oraz immunofluorescencyjnego komórek z KP.

Składnik	Objętość	Producent
bufor autoMACS Rinsing Solution	1425 ml	*Miltenyi Biotec*
MACS BSA Stock Solution	75 ml	
płodowa surowica bydlęca (ang. *fetal bovine serum*; FBS)	30 ml	*Sigma-Aldrich*

3.2.1.4. Barwienie immunofluorescencyjne i sort komórek

W kolejnym etapie, komórki po separacji MACS doczyszczano z zastosowaniem techniki aktywowanego fluorescencyjnie sortowania komórek (ang. *fluorescence-activated cell storting*; FACS). W tym celu, frakcję pozytywną (wzbogaconą w komórki $CD34^+$), otrzymaną po separacji magnetycznej - wirowano (350 x *g*, 10 min, 4°C), a osad komórkowy rozpipetowywano w buforze MACS (100 µl/10^6 komórek).

Tabela 7. Spis przeciwciał stosowanych do znakowania immunofluorescencyjnego komórek z KP przed sepracją FACS. PE: fikoerytryna (z ang. *phycoerythrin*), FITC: izotiocyjanian fluoresceiny (z ang. *fluorescein-5-isothiocyanate*), APC: allofikocyjanina (z ang. *allophycocyanin*); Markery liniowe (Lin): antygeny obecne na dojrzałych komórkach linii hematopoetycznych. Wszystkie przeciwciała zakupiono w firmie *BD Bioscience*.

Przeciwciało	Klon	Fluorochrom
anty-CD45	HI30	PE
Markery liniowe (Lin)		
anty-CD19	HIB19	FITC
anty-CD2	RPA-2.10	
anty-CD3	UCHT1	
anty-CD14	M5E2	
anty-CD66b	G10F5	
anty-CD24	ML5	
anty-CD56	NCAM16.2	
anty-CD16	3G8	
anty-CD235a	GA-R2	
anty-CD34	581	APC

Następnie, komórki znakowano przeciwciałami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko ludzkim antygenom, sprzężonymi z barwnikami fluorescencyjnymi (Tabela 7), dodając ich odpowiednie objętości, zgodnie z zaleceniami producenta (wszystkie przeciwciała zakupiono w firmie *BD Bioscience*). Komórki inkubowano z przeciwciałami przez 30 min w 4° C, po czym dopełniano próbówki za pomocą PBS i wirowano (350 x *g*, 10 min, 4°C). Tak wybarwione komórki poddawano następnie separacji za pomocą sortera BD FACSAria III (*Becton Dickinson*), sortując **komórki o fenotypie $CD45^{dim}Lin^{-}CD34^{+}$, określane w dalszej części pracy jako „komórki HSCs" lub „komórki $CD34^{+}$"**.
Po sorcie odbierano niewielką część wysortowanych komórek i analizowano je ponownie za pomocą sortera, w celu określenia czystości sortu.

3.2.2. Hodowle komórkowe

3.2.2.1. Ekspansja *ex vivo* komórek z KP

Wysortowane komórki $CD34^{+}$ poddawano namnażaniu w warunkach *in vitro* – w komercyjnej, bezsurowiczej pożywce hodowlanej Stem Span SFEM II (*Stem Cell Technologies*), dedykowanej do hodowli ludzkich komórek krwiotwórczych. Pożywkę tą uzupełniano dodając rekomendowany Suplement CC110 (1 ml na 100 ml pożywki; *Stem Cell Technologies*), zawierający 100 - krotnie stężoną mieszaninę cytokin, w tym FLT3L, trombopoetynę oraz SCF (producent nie dostarcza informacji o stężeniach poszczególnych cytokin). Ponadto, dodawano także antybiotyki, w tym penicylinę oraz streptomycynę (*Thermo Fisher Scientific*) do końcowego stężenia 100 U/ml.
O ile nie wskazano inaczej, we wszystkich doświadczeniach komórki $CD34^{+}$ inkubowano lub hodowano w wyżej opisanej pożywce.
Bezpośrednio po izolacji, komórki $CD34^{+}$ wysiewano na dołki 24-dołkowej płytki hodowlanej (*Corning*) w liczbie $0{,}5 \cdot 10^{6}$ komórek/dołek w 500 µl pożywki ($1 \cdot 10^{6}$ komórek/ml pożywki). Komórki hodowano następnie w standardowych warunkach hodowlanych (37° C, 5 % CO_2), monitorując gęstość hodowli za pomocą mikroskopu świetlnego z kontrastem faz Olympus IX81 (*Olympus*). Co 2 dni komórki liczono w komorze Bűrkera, część z nich odbierano z hodowli na dalsze eksperymenty, a pozostałą część rozsiewano do dołków płytek hodowlanych w gęstości $1 \cdot 10^{6}$ komórek/ml.

3.2.2.2. Hodowla komórek hiPS

Linia ludzkich komórek iPS (hiPS) została wyprowadzona i scharakteryzowana przez dr Sylwię Bobis-Wozowicz w Zakładzie Biologii Komórki WBBiB UJ (396). Komórki te otrzymano z komórek mezenchymalnych galarety Wharton'a sznura pępowinowego (ang. *umbilical cord Wharton's jelly MSCs*; UC-MSCs), wyizolowanych w Zakładzie Biologii Komórki WBBiB UJ z materiału tkankowego dostarczonego przez PBKM S.A.

Linia komórek hiPS została uzyskana w wyniku genetycznego reprogramowania komórek UC-MSCs z zastosowaniem zestawu CytoTune iPSC Reprogramming Kit (*Thermo Fisher Scientific*), bazującego na wektorach opartych o wirusy typu Sendai, przenoszących elementy kodujące dla czynników pluripotencji, w tym Oct-3/4, Sox2, Klf-4 oraz c-Myc (396). Szczegółowy protokół wyprowadzenia linii komórek hiPS został zamieszczony w pracy doświadczalnej naszej grupy badawczej (396).

Ponadto, w eksperymencie opisanym w Podrozdziale 3.2.6. pt. *Wizualizacja wnikania hiPS-EVs do komórek CD34$^+$ in vitro*, zastosowano EVs wydzielane przez linię komórek hiPS z ekspresją białka zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescence protein*; GFP), wyizolowanego po raz pierwszy z widłonoga (ang. *copepepod*) *Pontellina plumata* (określanego w literaturze jako „copGFP" (401)). Linia ta została uzyskana przez dr Sylwię Bobis-Wozowicz w Zakładzie Biologii Komórki WBBiB UJ, poprzez transdukcję wektorami lentiwirusowymi wyprowadzonej przez nią linii natywnych komórek hiPS. W skrócie, wektor kodujący ekspresję białka copGFP uzyskano z plazmidu PMIRH1-1-PA (*System Biosciences*), po wycięciu sekwencji dla pre-miRNA-1 i ponownym zamknięciu plazmidu przez ligację. Plazmidem tym transfekowano linię pakującą komórek HEK293T/17 (ATCC-CRL-11260; *LGC Standards*), wraz z plazmidami pakującymi psPAX2 oraz pMD2G (*Addgene*), z zastosowaniem czynnika transfekującego Lipofectamine 2000 (*Thermo Fisher Scientific*). Wektory lentiwirusowe z kasetą ekspresyjną dla białka copGFP izolowano następnie z pożywki znad hodowli linii pakującej poprzez wirowanie w celu usunięcia pozostałości komórek (250 x *g*, 5 min, 4^o C), a następnie filtrację nadsączu przez filtry o średnicy porów 0,2 µm (*Merck Millipore*). W 9 dniu od transdukcji za pomocą tego wektora, komórki hiPS wykazujące ekspresję copGFP sortowano przy użyciu sortera komórek FACS Aria III (*Becton Dickinson*).
Komórki hiPS (natywne oraz z ekspresją białka copGFP) hodowane były dzięki uprzejmości mgr Katarzyny Kmiotek-Wasylewskiej z Zakładu Biologii Komórki WBBiB UJ, zgodnie z uprzednio opublikowanym protokołem (396). Obejmował on zastosowanie pożywki bezsurowczej Essential 8 (*Thermo Fisher Scientific*), niezawierającej substancji odzwierzęcych, w warunkach bez warstwy komórek podścieliskowych. Pożywka ta była zmieniana w komórkach codziennie. Tuż przed pasażem, pożywka znad hodowli była przenoszona do probówek 50 ml typu falcon (*Sarstedt*), a następnie przechowywana w temperaturze -80^o C do czasu izolacji wydzielonych przez te komórki EVs.
Po osiągnięciu przez komórki konfluencji 80-90 % pasażowano je za pomocą roztworu 0,5 mM EDTA (*Thermo Fisher Scientific*). Po pasażu komórki odpłukiwano w pożywce i wysiewano na nowe naczynia hodowlane, opłaszczone uprzednio ludzką witronektyną przez 1 godz. w TP (500 µg⁄ml*; Thermo Fisher Scientific*). Dodatkowo, w celu zahamowania śmierci komórek oraz wspomagania ich adhezji do podłoża, bezpośrednio po pasażu dodawano do pożywki inhibitora Y27632 kinazy zależnej od Rho (ang. *Rho-associated protein kinase*; ROCK) w końcowym stężeniu 10 µM (*Merck Millipore*).

3.2.2.3. Hodowla komórek mezenchymalnych sznura pępowinowego

Komórki UC-MSCs, stosowane do testu adhezji (opisanego w Podrozdziale 3.2.15. pt. *Test oceniający adhezję komórek CD34$^+$ do komórek mezenchymalnych oraz komórek śródbłonka naczyniowego in vitro*) wyizolowane w Zakładzie Biologii Komórki WBBiB UJ metodą eksplantów (402), hodowano na naczyniach hodowlanych Primaria (*Corning*) w standardowych warunkach (5 % CO_2, 37° C) w pożywce DMEM/F12 (z ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*) (*Sigma-Aldrich*) z dodatkiem 10 % FBS (*Sigma-Aldrich*), penicyliny oraz streptomycyny (oba antybiotyki w stężeniu 100 U/ml; *Thermo Fisher Scientific*). Po osiągnięciu konfluencji na poziomie 80-90 %, komórki pasażowano za pomocą roztworu 0,25 % trypsyny-EDTA (*Thermo Fisher Scientific*), odpłukiwano w pożywce i wysiewano na nowe naczynia hodowlane.

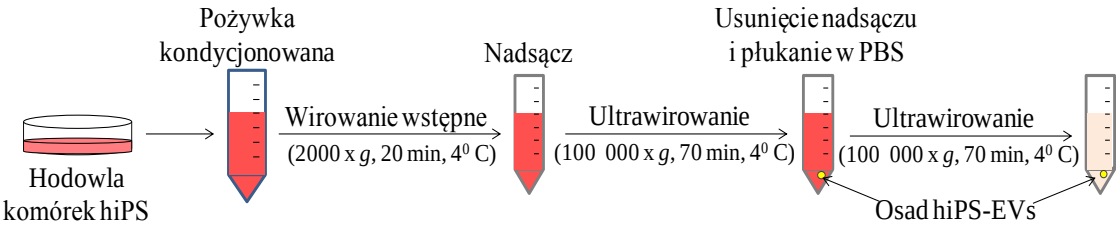
3.2.2.4. Hodowla komórek śródbłonka żyły pępowinowej

Ludzkie komórki śródbłonka żyły pępowinowej (ang. *human umbilical vein endothelial cells*; HUVECs; *Lonza*) stosowane do testu adhezji (opisanego w Podrozdziale 3.2.15. pt. *Test oceniający adhezję komórek CD34$^+$ do komórek mezenchymalnych oraz komórek śródbłonka naczyniowego in vitro*) hodowano w standardowych warunkach (5 % CO_2, 37° C) na na naczyniach hodowlanych (*Cornig*) w dedykowanej pożywce EGM-2MV (*Lonza*). Po osiągnięciu przez komórki konfluencji 80-90 % pasażowano je za pomocą roztworu 0,25 % trypsyny-EDTA (*Thermo Fisher Scientific*). Po pasażu komórki odpłukiwano w pożywce i wysiewano na nowe naczynia hodowlane.

3.2.3. Izolacja hiPS-EVs

hiPS-EVs były izolowane dzięki uprzejmości mgr Katarzyny Kmiotek-Wasylewskiej, w Zakładzie Biologii Komórki WBBiB UJ, z pożywki hodowlanej znad linii komórek hiPS.
Procedura izolacji hiPS-EVs opierała się na metodzie sekwencyjnego wirowania (395, 396, 402), rutynowo stosowanej w naszym zespole badawczym, której uproszczony schemat zamieszczono na Rycinie 10. Pożywki kondycjonowane zbierano z konfluentnych naczyń hodowlanych znad komórek hiPS, a następnie przechowywano w temperaturze -80^o C do czasu dalszej preparatyki. W dniu izolacji pożywki rozmrażano w 4^o C, a następnie poddawano wstępnemu wirowaniu (2 000 x *g*, 20 min, 4^o C) w celu pozbycia się fragmentów komórkowych. Następnie, nadsącze przenoszono do dedykowanych probówek ultrawirowniczych o pojemności 26,8 ml (*Kendro Lab*) i poddawano ultrawirowaniu (100 000 x *g*, 70 min, 4^o C) z zastosowaniem ultrawirówki Optima XPN-90 (*Beckman Coulter*) oraz rotora stałokątowego typu 50.2 Ti. Po ultrawirowaniu nadsącze usuwano, a osady zawieszano w PBS filtrowanej przez pory o średnicy 200 nm (*Lonza*), w celu odpłukania nanocząstek z resztek pożywki

hodowlanej. Następnie probówki ponownie ultrawirowano, a osad zawierający hiPS-EVs rozpipetowywano w 150 µl PBS (*Lonza*) i przenoszono do niskoretencyjnych probówek typu eppendorf (*Eppendorf*). Do czasu dalszych analiz próbki hiPS-EVs przechowywano w -80º C.



Rycina 10. Uproszczony schemat metody izolacji hiPS-EVs z pożywki kondycjonowanej, zbieranej znad hodowli komórek hiPS.

hiPS-EVs wydzielane przez komórki hiPS z nadekspresją copGFP (copGFP hiPS-EVs) otrzymywano z nadsączy hodowlanych w sposób analogiczny do protokołu opisanego dla hiPS-EVs izolowanych z natywnych komórek iPS.

3.2.4. Charakterystyka ilościowa i jakościowa próbek zawierających hiPS-EVs

Analiza zawartości biologicznej hiPS-EVs została zamieszczona w opublikowanej pracy doświadczalnej (396). Jednakże, na potrzeby niniejszej pracy przeprowadzono dodatkowe analizy jakościowe oraz ilościowe próbek hiPS-EVs stosowanych w eksperymentach, opisane poniżej.

3.2.4.1. Pomiar stężenia białka w próbkach hiPS-EVs

Stężenie białek w osadach zawierających hiPS-EVs, wykorzystywane następnie do pośredniego oznaczenia ilości pęcherzyków, oznaczano metodą Bradforda (402). W tym celu, w probówkach typu eppendorf przygotowywano rozcieńczenia standardu białkowego (2 mg/ml; *Sigma-Aldrich*) w zakresie od 0 µg/ml do 12 µg/ml, dodając jego odpowiednią objętość do 1 ml odczynnika Bradforda (*Sigma-Aldrich*). Zawiera on błękit Coomassie G-250, którego właściwości spektralne ulegają zmianie w wyniku oddziaływania z białkami. W konsekwencji, barwnik ten, w formie związanej z białkami wykazuje maksimum absorbancji przy długości fali 595 nm, co umożliwia pomiar kolorymetryczny. Przygotowywano także próbkę badaną, mieszając 1 µl próbki hiPS-EVs z 1 ml odczynnika Bradforda. Wszystkie próbki inkubowano przez 10 min bez dostępu do światła, a następnie pipetowano po 200 µl każdej z próbek do dołków płytki 96-dołkowej (*Falcon*) w tryplikacie. Następnie, przeprowadzano pomiar absorbancji poszczególnych roztworów próbek, z zastosowaniem czytnika Multiskan FC Microplate Reader (*Thermo Fisher Scientific*). Na podstawie średnich wartości absorbancji dla standardów białkowych wyznaczano krzywą regresji, z której równania obliczano następnie średnie stężenie białka w próbce hiPS-EVs.

3.2.4.2. Analiza stężenia cząstek oraz rozkładu wielkościowego hiPS-EVs

Rozkład wielkościowy pęcherzyków w wyizolowanych próbkach hiPS-EVs mierzono z wykorzystaniem techniki analizy śledzenia trajektorii ruchu nanocząstek (ang. *nanoparticle tracking analysis*; NTA), opartego o ruchy Browna. Szybkość tego typu ruchu zależy m.in. od średnicy hydrodynamicznej cząstki w roztworze, przy czym, jak wynika z równania Stokesa-Einsteina, im większa cząstka, tym jej ruch jest wolniejszy (403, 404).
Przed pomiarem, przechowywane w temperaturze -80^{o} C próbki hiPS-EVs rozmrażano w 4^{o} C, a następnie odpowiednio rozcieńczano w 3 ml PBS przefiltrowanego przez filtr o średnicy porów 200 nm (*Lonza*), uzyskując końcowe stężenie hiPS-EVs wynoszące 2 µg białka/ml. Przy obliczeniach posługiwano się stężeniem białka w preparatach zawierających hiPS-EVs, uzyskanym z pomiaru metodą Bradforda. Następnie, tak przygotowane próbki poddawano analizie NTA z zastosowaniem analizatora NanoSight NS300 oraz oprogramowania NTA (*Malvern*). Każdorazowo, próbkę poddawano trzykrotnej akwizycji w systemie ciągłego przepływu generowanego przez dedykowaną pompę strzykawkową, zapisując trzy 1-minutowe filmy z trajektorią ruchu cząstek, przy poziomie czułości kamery (ang. *camera level*) wynoszącym 13. Następnie, na podstawie zebranych danych wyznaczano średni rozkładu wielkościowy średnicy hydrodynamicznej oraz stężenie pęcherzyków, wyrażone jako liczbę cząstek na ml analizowanej próbki. Analizę przeprowadzono na trzech próbkach hiPS-EVs, pochodzących z niezależnych izolacji pęcherzyków z pożywki kondycjonowanej znad komórek hiPS, stosując parametr poziomu odcięcia (ang. *treshold*) równy 3. Przed pomiarem każdej z próbek aparat dokładnie płukano ultraczystą wodą, sprawdzając także czystość PBS stosowanej do rozcieńczania próbek.

3.2.4.3. Mikroskopia sił atomowych

Analizę próbek hiPS-EVs z zastosowaniem mikroskopii sił atomowych (ang. *atomic force microscopy*; AFM) przeprowadzono analogicznie do eksperymentu szczegółowo opisanego w opublikowanej pracy doświadczalnej (396). Doświadczenie wykonano we współpracy z dr Michałem Sarną z Pracowni Obrazowania i Spektroskopii Sił Atomowych Małopolskiego Centrum Biotechnologii UJ, dzięki uprzejmości Kierownika Pracowni prof. dr hab. Tadeusza Sarny.
Próbka hiPS-EVs zawieszona w filtrowanej przez filtr o średnicy porów 200 nm PBS (*Lonza*) była nakrapiana na powierzchnię płytki wykonanej z miki, a następnie inkubowana przez 20 min w TP. Po tym czasie niezwiązana część próbki była delikatnie odpłukiwana za pomocą PBS i poddawana analizie z zastosowaniem mikroskopu Bioscope Catalyst (*Bruker*) oraz sondy wykonanej z azotku krzemu o promieniu krzywizny ostrza 2 nm (*Bruker*). W celu uzyskania 2-wymiarowych oraz 3-wymiarowych obrazów pęcherzyków obecnych w badanych próbkach, pomiar topografii powierzchni przeprowadzano w trybie odczytu Peak Force Tapping, dedykowanego do analizy delikatnych cząstek biologicznych, w tym EVs (405).

3.2.4.4. Analiza cytometryczna biologicznej zawartości hiPS-EVs

Analizę fenotypu hiPS-EVs przeprowadzano z zastosowaniem wysokorozdzielczej cytometrii przepływowej. W tym celu, hiPS-EVs inkubowano z mysimi przeciwciałami monoklonalnymi (sprzężonymi z barwnikami fluorescencyjnymi) skierowanymi przeciwko wybranym ludzkim antygenom, których listę zamieszczono w Tabeli 8. Dodatkowo, stosowano także barwnik fluorescencyjny RNA Select Dye (*Thermo Fisher Scientific*), który po związaniu się z RNA i wzbudzeniu laserem niebieskim (488 nm), emituje zieloną fluorescencję (maksimum emisji przy długości fali 530 nm). Przygotowywano również próbki kontrolne: niebarwione hiPS-EVs oraz inkubowane z odpowiednimi przeciwciałami, stanowiącymi kontrole izotypowe (Tabela 8).

Tabela 8. Spis przeciwciał stosowanych do barwienia immunofluorescencyjnego hiPS-EVs do pomiaru z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Alx647: typ barwnika fluorescencyjnego Alexa o maksimum wzbudzenia dla fali o długości 647 nm.

Przeciwciało	Klon	Izotyp	Fluorochrom	Producent
kontrola izotypowa IgG1κ	MOPC-21	-	APC	*BioLegend*
kontrola izotypowa IgG3	133316		APC	*R&D Systems*
kontrola izotypowa IgM	MM30		Alx647	*BioLegend*
anty-CD45	HI30	IgG1κ	APC	
anty-CD34	581	IgG1κ		
anty-CD9	MEM-61	IgG1κ		*Thermo Fisher Scientific*
anty-CD63	MEM-259	IgG1κ		
anty-CD81	5A6	IgG1κ		*BioLegend*
anty-SSEA-4	MC-813-70	IgG3		
anty-CD90	5E10	IgG1κ		
anty-CD105	43A3	IgG1κ		
anty-KDR	89106	IgG1κ		*R&D Systems*
anty-Tra-1-60	TRA-1-60R	IgM	Alx647	*BioLegend*

Przed barwieniem, przygotowywano probówki typu eppendorf zawierające po 300 µl PBS przefiltrowanego przez filtr o średnicy porów 200 nm (*Lonza*). Następnie, dodawano do nich 0,3 µl barwnika RNA Select (końcowe stężenie 5 µM) oraz odpowiednie przeciwciało w objętości zalecanej przez producenta do przeprowadzenia 1 testu. Reagenty dokładnie mieszano poprzez worteksowanie eppendorfów, a następnie wirowano (21 000 x *g*, 20 min, 4^{o} C) w celu eliminacji potencjalnych agregatów białkowych oraz innych zanieczyszczeń obecnych w użytych odczynnikach. Nadsącze po odwirowaniu ostrożnie przenoszono do nowych eppendorfów, a następnie dodawano do nich hiPS-EVs do końcowego stężenia białka wynoszącego 2 µg/ml. Tak

przygotowane próbki mieszano i inkubowano w 4^{o} C przez 30 min, a następnie poddawano je analizie z zastosowaniem cytometru przepływowego Apogee A50-Micro (*Apogee Flow Systems*), dedykowanego do analizy nanocząstek. Analizę otrzymanych danych prowadzono z zastosowaniem oprogramowania Histogram (*Apogee Flow Systems*).
Dodatkowo, przed właściwymi pomiarami próbek hiPS-EVs analizowano także próbki stanowiące jedynie mieszaniny odczynników do barwienia (odpowiednie przeciwciała oraz RNA Select, zawieszone w PBS), przygotowane w sposób analogiczny do mieszanin przeznaczonych do znakowania pęcherzyków. Próbki te stanowiły dodatkowe kontrole, których zastosowanie minimalizowało ryzyko otrzymania sygnałów fałszywie pozytywnych, pochodzących od nanocząstek stanowiących zanieczyszczenie stosowanych reagentów.

Przed pomiarem, cytometr kalibrowano z zastosowaniem dedykowanych kulek Apogee Calibrating Beads #1493 (*Apogee Flow Systems*), będących mieszaniną kulek o średnicy od 110 do 1300 nm, w tym kulek: i) polistyrenowych, wykazujących zieloną fluorescencję oraz ii) niefluoryzujących kulek silikonowych. Zastosowanie takiej mieszaniny kalibracyjnej umożliwia z jednej strony prawidłowe ustawienie punktu odcięcia progu detekcji powyżej szumu aparaturowego (z ang. *treshold*) i ocenę rozdzielczości aparatu w kanale fluorescencji, z drugiej zaś daje możliwość dokładniejszego oszacowania wielkości analizowanych obiektów. Wynika to z faktu, iż współczynnik rozproszenia światła cząstek biologicznych jest bardziej zbliżony do współczynnika dla kulek silikonowych, w porównaniu do typowo stosowanych odczynników kalibracyjnych, zawierających jedynie kulki polistyrenowe (406).

Dodatkowo, tak przygotowane próbki hiPS-EVs analizowano również za pomocą obrazowego cytometru przepływowego ImageStream X Mk II, sterowanego poprzez oprogramowanie ISX (*Amnis Corp*.). Obiekty zbierano przy niskiej prędkości przepływu z zastosowaniem obiektywu o powiększeniu 60x. Analizę uzyskanych danych przeprowadzono przy użyciu oprogramowania IDEAS (*Amnis Corp*.).

Ponadto, na potrzeby weryfikacji danych eksperymentalnych dotyczących wpływu hiPS-EVs na obecność wybranych molekuł adhezyjnych na komórkach CD34^{+} z KP (omówienie tych wyników znajduje się w Podrozdziale 4.10. pt. *Analiza wpływu hiPS-EVs na adhezję komórek CD34^{+} in vitro*), przygotowano także próbki hiPS-EVs, które barwiono barwnikiem RNA Select oraz przeciwciałem przeciwko antygenowi LFA-1 (z ang. *lymphocyte function associated antigen 1;* klon m24, *BioLegend*). Próbki przygotowywano oraz analizowano z zastosowaniem cytometru Apogee A50-Mico w sposób analogiczny do metodologii opisanej dla analizy fenotypowej hiPS-EVs, opisanej w niniejszym Podrozdziale.

3.2.4.5. Analiza obecności białek w próbkach hiPS-EVs metodą Western Blot

W celu detekcji obecności wybranych białek metodą Western Blot, przygotowywano próbki białkowe hiPS-EVs oraz ich komórek rodzicielskich. Skład poszczególnych buforów stosowanych podczas przygotowania, rozdziału i transferu próbek zamieszczono w Tabeli 9.
Lizaty komórek hiPS uzyskano dzięki uprzejmości dr Sylwii Bobis-Wozowicz. 10 µg białka z hiPS-EVs i komórek hiPS (stężenie uzyskano poprzez pomiar metodą Bradforda) mieszano z buforem lizującym (*Cell Signalling*) z dodatkiem mieszaniny 100 µl/ml inhibitorów proteinaz (*Thermo Fisher Scientific*), zgodnie z protokołem producenta. Następnie próbki dodatkowo lizowano przez 5 min w 4^{o} C i dodawano do nich bufor obciążający Laemmliego, zgodnie z protokołem producenta, poddając otrzymaną mieszaninę denaturacji w 70^{o} C przez 10 min. W kolejnym etapie, tak przygotowane próbki lizatów białkowych nakładano do studzienek żeli Mini-PROTEAN TGXPrecast Gel (*Bio-Rad*). Jako marker wielkości białek zastosowano odczynnik Page Ruller Prestained Protein Ladder (*Thermo Fisher Scientific*), w objętości 4 µl na studzienkę żelu. Żele umieszczano w zestawie do elektroforezy Mini-PROTEAN Tetra cell (*Bio-Rad*) i dokonywano ich rozdziału przy stałym napięciu 200 V przez 30 min, w obecności buforu rozdzielającego Electrophoresis Running Buffer (*Bio-Rad*), rozcieńczonego w wodzie dejonizowanej. W następnym kroku, dokonywano transferu rozdzielonych elektroforetycznie próbek z żelu na membrany wykonane z polifluorku winylidenu (ang. *polyvinylidene fluoride*; PVDF), za pomocą zestawu Trans-Blot Turbo RTA Mini PVDF Transfer (*Bio-Rad*), przy natężeniu 1,3 A i napięciu 25 V, w czasie 7 min. Następnie, membrany cięto i blokowano przez 1 godz. w buforze TBS-T rozcieńczonym w wodzie dejonizowanej, z dodatkiem 1% surowiczej albuminy wołowej (ang. *bovine serum albumin*; BSA; *Sigma-Aldrich*).

Tabela 9. Skład buforów stosowanych do analizy obecności białek w próbkach hiPS-EVs za pomocą metody Western Blot.

Rodzaj buforu	Skład
Bufor lizujący (10x) (*Cell Signalling*)	20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 mM Na_2EDTA 1mM EGTA 1 % Triton X-100 2,5 mM azydek sodu 1 mM beta-glicerofosforan 1 mM Na_3VO_4, 1 µg/ml leupeptyna (pH 7,5)
Bufor obciążający Laemmliego (4x) (*Bio-Rad*)	277,8 mM Tris-HCl 44,4 % (v/v) glycerol 4,4 % SDS 0,02 % błękit bromofenolowy (pH 6,8)

Bufor rozdzielający Electrophoresis Running Buffer (10x) (*Bio-Rad*)	25 mM Tris 192 mM glicyna 0,1% SDS (pH 8,3)
Bufor TBS-T (10x)	1,72 g NaCl (*POCH*) 10 ml 1M Tris-HCl (*POCH*) 0,1 g Tween 20 (*Sigma-Aldrich*) 190 ml H_2O (pH 7,6)

W następnym etapie, membrany inkubowano w temp. 4^o C (przez całą noc) z pierwszorzędowymi przeciwciałami przeciwko następującym białkom: CD9, CD63, synteninie, kalneksynie oraz β-aktynie. Spis stosowanych przeciwciał zamieszczono w Tabeli 10. Następnie, membrany płukano 3 - krotnie przez 15 min w buforze TBS-T i dodawano odpowiednich przeciwciał drugorzędowych: króliczego anty-koziego IgG lub koziego anty-mysiego IgG (oba z *Thermo Fisher Scientific*), sprzężonych z peroksydazą chrzanową (ang. *horseradish peroxidase*; HRP). Membrany inkubowano z przeciwciałami drugorzędowymi przez 1 godz. w TP i ponownie odpłukiwano w sposób analogiczny do płukania po inkubacji z przeciwciałami pierwszorzędowymi. Wszystkie zastosowane w analizie Western Blot przeciwciała rozcieńczano przed dodaniem w 4 ml buforu TBS-T z dodatkiem 1% BSA, stosując rozcieńczenie zalecane przez producenta. W celu wykrycia obecności badanych białek, membrany pokrywano następnie 1,5 ml substratu dla HRP (Luminata Crescendo Western HRP Substrate; *Merck Millipore*) i dokonywano pomiaru chemiluminescencji od produktu powstałego w wyniki aktywności tego enzymu. Detekcję sygnału przeprowadzano za pomocą aparatu Gel Doc XR+ Gel Documentation System (*Bio-Rad*) oraz dedykowanego oprogramowania Image Lab (*Bio-Rad*).

Tabela 10. Spis przeciwciał pierwszorzędowych stosowanych do analizy obecności białek metodą Western Blot w próbkach hiPS-EVs oraz ich komórkach rodzicielskich.

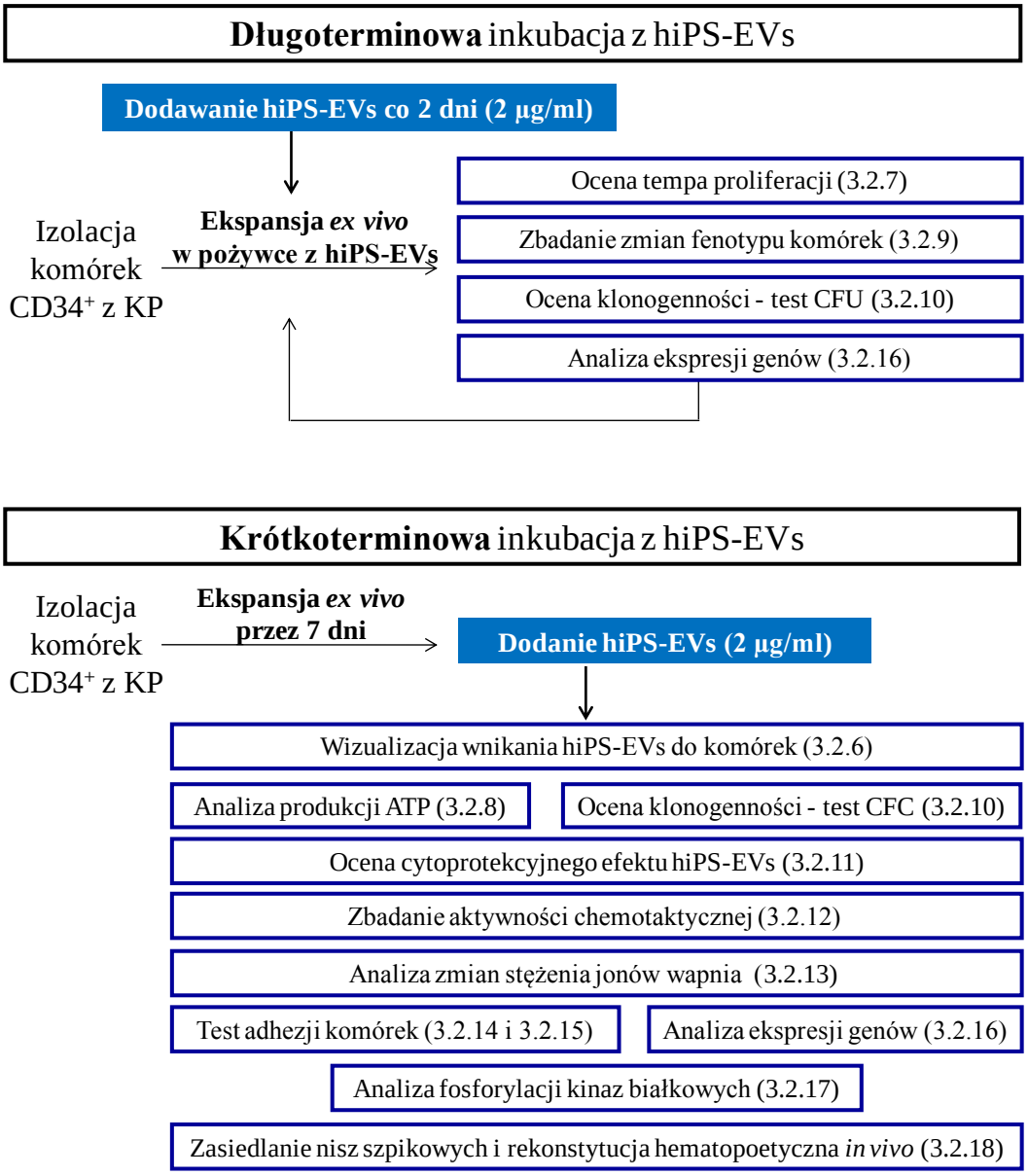
Rozpoznawany antygen	Pochodzenie	Izotyp	Producent
CD9	mysie	monoklonalne IgG	*Thermo Fisher Scientific*
CD63			
syntenina	kozie	poliklonalne IgG	
kalneksyna			
β-aktyna	mysie	monoklonalne IgG	

3.2.5. Inkubacja komórek CD34$^+$ z hiPS-EVs

Komórki CD34$^+$ uprzednio wyizolowane z KP, a następnie namnażane *ex vivo*, były poddawane działaniu hiPS-EVs w hodowli *in vitro*. W każdym z eksperymentów stosowano dawkę hiPS-EVs odpowiadającą 1 µg białka oznaczonego metodą Bradforda przypadającą na $2 \cdot 10^5$ komórek CD34$^+$ zawieszonych w objętości 500 µl pożywki,

uzyskując tym samym końcowe stężenie hiPS-EVs wynoszące 2 µg/ml. Każdorazowo przeliczano objętość próbki hiPS-EVs przypadającą na liczbę komórek użytą w danym doświadczeniu, zachowując tą samą dawkę dodawanych pęcherzyków na daną liczbę komórek.

W niniejszej pracy badano wpływ zarówno krótko-, jak długoterminowej inkubacji z hiPS-EVs na wybrane właściwości biologiczne komórek $CD34^+$ z KP (Rycina 11). Każdorazowo, we wszystkich eksperymentach kontrolę stanowiły komórki $CD34^+$, które były poddawane inkubacji w takich samych warunkach, ale w pożywce bez dodatku z hiPS-EVs.



Rycina 11. Schemat metodyki inkubacji komórek $CD34^+$ z hiPS-EVs. W zależności od typu prowadzonej analizy, komórki $CD34^+$ po izolacji z KP poddawano ekspansji *ex vivo* w obecności hiPS-EVs (długoterminowa inkubacja; górny panel) lub najpierw je namnażano, a następnie po 7 dniach ekspansji inkubowano przez 2-48 godz. z hiPS-EVs (krótkoterminowa inkubacja; dolny panel). W nawiasach podano numery Podrozdziałów ze szczegółowym opisem protokołów eksperymentalnych, w których zastosowano dany typ inkubacji.

3.2.5.1. Inkubacja długoterminowa

W doświadczeniach mających na celu analizę wpływu hiPS-EVs na funkcje komórek $CD34^+$ z KP w trakcie ich ekspansji w warunkach *ex vivo*, stosowano system inkubacji długoterminowej. W tym celu komórki $CD34^+$ bezpośrednio po izolacji z KP namnażano w standardowych warunkach hodowlanych (5 % CO_2, 37° C) przez 14 dni, w pożywce zawierającej hiPS-EVs (2 µg/ml). Pożywkę wymieniano co 2 dni, poprzez odpłukiwanie komórek przy użyciu PBS i ich wirowania (300 x *g*, 10 min, TP), zawieszanie w świeżej pożywce z dodatkiem hiPS-EVs i wysianie na naczynia hodowlane w celu dalszej ekspansji.

3.2.5.2. Inkubacja krótkoterminowa

W pozostałych eksperymentach stosowano inkubację krótkoterminową komórek HSCs z hiPS-EVs. W tym celu, komórki $CD34^+$ poddawano najpierw 7-dniowej ekspansji w pożywce bez dodatku hiPS-EVs, aby zwiększyć ich liczbę przed kolejnymi doświadczeniami. Następnie, komórki te inkubowano w świeżej pożywce z dodatkiem hiPS-EVs (2 µg/ml) przez czas od 2 do 48 godz. (czas inkubacji zależny był od rodzaju eksperymentu, co opisano przy poszczególnych procedurach) w standardowych warunkach hodowlanych (5 % CO_2, 37° C), po czym niezwiązane i niezinternalizowane hiPS-EVs odpłukiwano przy użyciu PBS i wirowania komórek (300 x *g*, 10 min, TP). Odpłukane komórki poddawano następnie dalszym analizom.

3.2.6. Wizualizacja wnikania hiPS-EVs do komórek $CD34^+$ *in vitro*

Komórki $CD34^+$ z KP, poddane uprzedniej ekspansji *ex vivo* przez 7 dni, wysiewano na szalki hodowlane WillCo-dish (*WillCo Wells*) o średnicy 3,5 cm, w liczbie $2 \cdot 10^5$ komórek/szalkę w 500 µl pożywki hodowlanej. Dzięki zastosowaniu szklanego dna, szalki te dedykowane są do obrazowania z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej. Dla zwiększenia efektywności adhezji komórek do podłoża, w celu ich immobilizacji dla potrzeb analizy mikroskopowej, przed wysianiem komórek szalki pokrywano 1 ml roztworu ludzkiej fibronektyny w PBS (50 µg/ml; *Sigma-Aldrich*) przez 30 min w TP, po czym nadmiar roztworu usuwano. Na tak przygotowane szalki wysiewano komórki i inkubowano je przez 2 godz. (37° C, 5 % CO_2), umożliwiając ich adhezję do dna szalki. Po tym czasie do komórek dodawano hiPS-EVs wydzielane przez komórki hiPS z ekspresją copGFP (copGFP hiPS-EVs; końcowe stężenie 2 µg/ml) i inkubowano przez kolejne 2 godz. W kolejnym etapie komórki ostrożnie przepłukiwano dwukrotnie roztworem PBS w celu usunięcia niezwiązanych i niezinternalizowanych copGFP hiPS-EVs i ponownie dodawano świeżą pożywkę. Następnie, wybarwiano jądra komórek za pomocą barwnika fluorescencyjnego Hoechst 33342 (Hoe; 1 µg/ml; *BD Pharmingen*), dodając go 5 min przed analizą w TP. Tak przygotowane komórki po inkubacji z copGFP hiPS-EVs poddawano następnie analizie z zastosowaniem mikroskopu fluorescencyjnego Leica DMI6000B wer. DMI7000

(*Leica Microsystems*) z kontrastem interferencyjno-modulacyjnym. Zdjęcia komórek wykonywano z zastosowaniem olejowego obiektywu immersyjnego 100 x o aperturze numerycznej 1,47 oraz 14-bitowej kamery EM-CCD Hamamatsu 9100–02, kontrolowanej przez oprogramowanie Leica Application Suite Advanced Fluorescence Software (*Leica Microsystems*). Sygnał dla Hoe oraz copGFP odczytywano przy użyciu kostek filtrowych, odpowiednio "A4" oraz "GFP". Proces dekonwolucji obrazu przeprowadzano za pomocą oprogramowania LAS-AF (*Leica Microsystems*).

3.2.7. Analiza tempa ekspansji *ex vivo* komórek CD34$^+$ z KP

Wysortowane komórki CD34$^+$ hodowano bez lub w obecności hiPS-EVs przez 14 dni (w systemie inkubacji długoterminowej, opisanej szczegółowo w Podrozdziale 3.2.5.1. pt. *Inkubacja długoterminowa*). Bezpośrednio po izolacji oraz w 4, 6, 8, 11 i 14 dniu hodowli komórki namnażane w pożywce z dodatkiem hiPS-EVs oraz w pożywce kontrolnej (bez hiPS-EVs) liczono za pomocą komory Bűrkera. Na podstawie otrzymanych w ten sposób wyników określano tempo proliferacji komórek, wyrażone jako krotność przyrostu ich liczby w porównaniu do liczby komórek wysianych przy rozpoczynaniu ekspansji *ex vivo*, bezpośrednio po izolacji. Ponadto, na podstawie uzyskanych danych obliczano także tempo proliferacji komórek jako czas podwojenia populacji (liczby komórek) pomiędzy poszczególnymi punktami analizy.

3.2.8. Analiza aktywności metabolicznej komórek CD34$^+$

Komórki CD34$^+$ poddane uprzedniej ekspansji *ex vivo* przez 7 dni wysiewano na białe płytki 96-dołkowe (*Perkin Elmer*) w liczbie $5 \cdot 10^4$ komórek na dołek w tryplikacie w pożywce hodowlanej, do której dodawano następnie hiPS-EVs (końcowe stężenie 2 µg/ml). Kontrolę stanowiły komórki w pożywce bez dodatku hiPS-EVs. Następnie, komórki hodowano w standardowych warunkach przez 2, 24 lub 48 godz. (zgodnie z protokołem szczegółowo opisanym w Podrozdziale 3.2.5.2. pt. *Inkubacja krótkoterminowa*). Po tym czasie, dokonywano pomiaru stężenia adenozynotrifosforanu (ang. *adenosine triphosphate*; ATP) obecnego w komórkach, jako jednego ze sposobów analizy aktywności metabolicznej komórek w hodowli *in vitro* (407). Wykorzystano w tym celu komercyjny zestaw ATPLite Lumiescence Assay System (*Perkin Elmer*), zgodnie z protokołem producenta. W skrócie, komórki lizowano dedykowanym buforem lizującym w celu uwolnienia do roztworu wewnątrzkomórkowego ATP, a następnie dodawano lucyferazę oraz jej substrat. W wyniku reakcji lucyferazy z ATP powstaje oksylucyferaza oraz dochodzi do emisji luminescencji.

Po dodaniu reagentów, odczytywano sygnały luminescencji przy użyciu czytnika Infinite M200 Pro analyzer oraz oprogramowania i-control (*Tecan*). Stężenie ATP w dołkach z komórkami obliczano na podstawie równania krzywej regresji otrzymanej dla standardów ATP, dołączonych do zestawu.

3.2.9. Fenotypowanie komórek CD34$^+$ w trakcie ekspansji *ex vivo*

Wysortowane komórki CD34$^+$ hodowano bez lub w obecności hiPS-EVs przez 14 dni, analogicznie do hodowli opisanej w Podrozdziale 3.2.7. pt. *Analiza tempa ekspansji ex vivo komórek CD34$^+$ z KP*. Bezpośrednio po izolacji oraz w 4, 6, 8, 11 i 14 dniu hodowli, komórki poddawano analizie ich fenotypu za pomocą cytometrii przepływej. W tym celu $1 \cdot 10^5$ komórek barwiono zgodnie z zaleceniami producenta za pomocą odpowiednich mysich przeciwciał monoklonalnych sprzężonych z barwnikiem fluorescencyjnym APC lub PE, skierowanych przeciwko ludzkiemu antygenowi CD34 (*BD Bioscience*) oraz markerom charakterystycznym dla poszczególnych linii komórek hematopoetycznych, których spis zamieszczono w Tabeli 11 (wszystkie przeciwciała zakupiono w firmie *BD Bioscience*).

Tabela 11. Spis przeciwciał stosowanych do barwienia immunofluorescencyjnego komórek z KP w celu analizy zmian ich fenotypu w trakcie ekspansji *ex vivo*.

Linia komórek krwi poddawana detekcji	Stosowane przeciwciało	Klon	Fluorochrom
limfocytów T	anty-CD3	UCHT1	FITC
limfocytów B	anty-CD19	HIB19	FITC
monocytarno-makrofagowa	anty-CD14	M5E2	FITC
granulocytarna	anty-CD66b	G10F5	FITC
erytrocytarna	anty-CD235a	GA-R2	FITC
megakariocytarna	anty-CD41	HIP8	APC

Komórki barwiono z przeciwciałami w 300 µl buforu MACS przez 30 min w 4^o C, po czym dopełniano roztworem PBS i wirowano (300 x *g*, 10 min, 4^o C). Osad komórkowy zawieszano w 300 µl buforu MACS i analizowano za pomocą cytometru przepływowego BD LSRFortesa oraz oprogramowania BD FACSDiva wer. 8.1. (*Becton Dickinson*).

3.2.10. Test potencjału klonogennego komórek CD34$^+$

W celu określenia wpływu hiPS-EVs na potencjał klonogenny komórek CD34$^+$, przeprowadzano test klonogenności w metylocelulozie (ang. *colony-forming cell assay*; CFC). Test przeprowadzano na komórkach uprzednio inkubowanych krótko- lub długoterminowo z hiPS-EVs.

W przypadku inkubacji krótkoterminowej, po 7 dniach ekspansji komórek CD34$^+$ w pożywce bez pęcherzyków, komórki inkubowano przez 2, 6 lub 24 godz. w świeżej pożywce z dodatkiem hiPS-EVs (procedurę szczegółowo opisano w Podrozdziale 3.2.5.2. pt. *Inkubacja krótkoterminowa*). Po tym czasie, niezwiązane pęcherzyki odpłukiwano, a następnie komórki CD34$^+$ (w liczbie 500) wysiewano w 1 ml metylocelulozy (na szalkę o średnicy 3cm; *BD Falcon*).

W przypadku inkubacji długoterminowej, komórki CD34$^+$ namnażano w obecności hiPS-EVs przez 14 dni, analogicznie do protokołu opisanego w Podrozdziale 3.2.7.

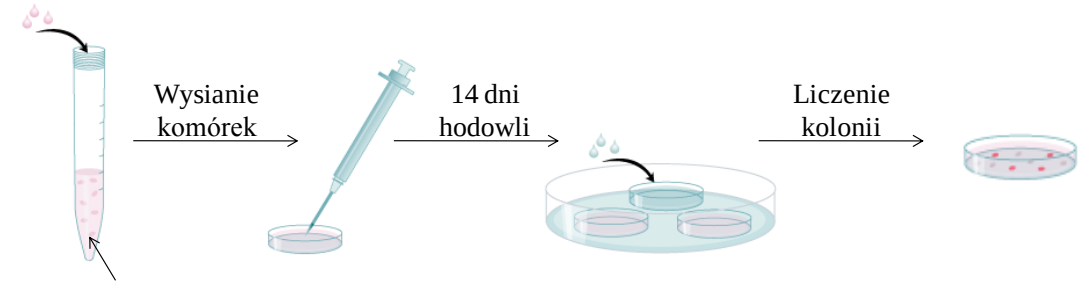
pt. *Analiza tempa ekspansji ex vivo komórek CD34$^+$z KP*. W 4, 6, 8, 11 oraz 14 dniu hodowli, każdorazowo odbierano po 500 komórek i umieszczano w 1 ml metylocelulozy (na szalkę o średnicy 3cm; *BD Falcon*).

W obu wariantach inkubacji z hiPS-EVs, kontrolę stanowiły komórki CD34$^+$ inkubowane w pożywce hodowlanej bez dodatku hiPS-EVs.
W celu wysiania komórek do testu CFC, najpierw zawieszano je w 100 µl odczynnika Cell Resuspension Medium (*R&D Systems*), a następnie mieszano z 1 ml komercyjnie dostępnej, półpłynnej pożywki na bazie metylocelulozy (Human Methylcelulose Enriched Media; *R&D Systems*) za pomocą strzykawki insulinowej (*Polfa*) z igłą o średnicy 1,2 mm (*BD Microlance 3*). Skład stosowanej pożywki zamieszczono w Tabeli 12.

Tabela 12. Skład komercyjnej pożywki hodowlanej Human Methylcelulose Enriched Media (*R&D Systems)*, wykorzystywanej do przeprowadzania testu klonogenności komórek CD34$^+$ z KP.

Składnik	Stężenie
Metyloceluloza w pożywce IMDM (z ang. *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*)	1,4 %
FBS	25 %
BSA	2 %
L-Glutamina	2 mM
2-Merkaptoetanol	$5 \cdot 10^{-5}$M
SCF	50 ng/ml
GM-CSF	20 ng/ml
G-CSF	20 ng/ml
IL-3	20 ng/ml
IL-6	20 ng/ml
Erytropoetyna	3 U/ml

Tak przygotowaną mieszaninę odstawiano na kilka minut w celu pozbycia się ewentualnych pęcherzyków powietrza, a następnie rozprowadzano równomiernie na szalki Petriego o średnicy 3 cm (*BD Falcon*), które umieszczano w szalkach o średnicy 10 cm zawierających wodę, zapewniającą odpowiednią wilgotność hodowli. Po 14 dniach hodowli liczono powstałe kolonie z uwzględnieniem podziału na ich poszczególne typy, w tym: kolonie erytroidalne typu **BFU-E** (ang. *burst forming unit-erythroid*) lub **CFU-E** (ang. *colony forming unit-erythroid)*, kolonie mieszane (ang. *colony forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte*; **GEMM**) oraz kolonie granulocytarno-makrofagowe (ang. *colony forming unit-granulocyte-macrophage*; **CFU-GM**). Kolonie identyfikowano na podstawie ich morfologii, z zastosowaniem mikroskopu świetlnego Olympus IX81 (*Olympus*) (Rycina 12). Przy ocenie morfologicznej korzystano z atlasu kolonii Atlas of Human Hematopoietic Colonies (*Stem Cell Technologies*).



Rycina 12. Uproszczony schemat obrazujący zasadę przeprowadzania testu CFC w celu analizy potencjału klonogennego komórek CD34$^+$ z KP. Na schemacie wykorzystano elementy grafiki dostępne na stronie producenta *R&D Systems* www.rndsystems.com.

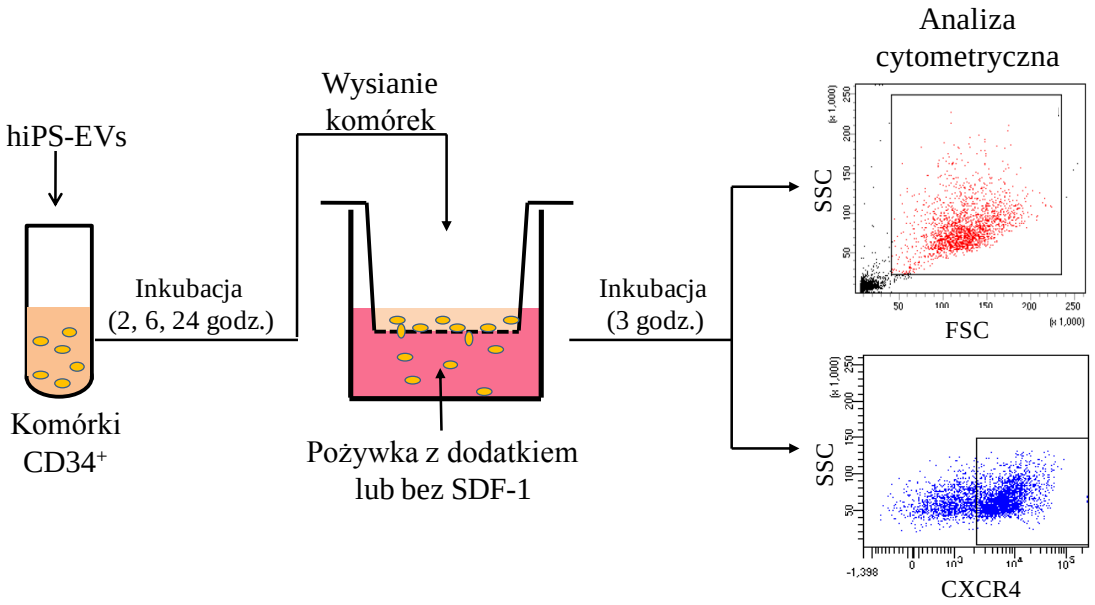
3.2.11. Test apoptozy indukowanej staurosporyną

$2 \cdot 10^5$ komórek CD34$^+$ poddanych uprzednio ekspansji *ex vivo* przez czas 7 dni, inkubowano następnie z hiPS-EVs przez 2 godz., zgodnie z procedurą szczegółowo opisaną w Podrozdziale 3.2.5.2. pt. *Inkubacja krótkoterminowa.* Następnie, niezwiązane pęcherzyki odpłukiwano, a komórki zawieszano w pożywce zawierającej staurosporynę (*Sigma-Aldrich*) w stężeniu 100 nM i inkubowano przez 24 godz. (5% CO_2, 37° C) na płytce 24-dołkowej. Dodatkowo, wysiewano również komórki CD34$^+$ w pożywce niezawierającej staurosporyny (kontrola testu). Po czasie inkubacji komórki zbierano z dołków, odwirowywano (300 x *g*, 10 min, TP), a następnie barwiono za pomocą zestawu Annexin V Apoptosis Detection Kit (*BD Bioscience*), zgodnie z protokołem producenta. W skrócie, komórki zawieszano w dedykowanym buforze do barwienia (100 µl/10^5 komórek) rozcieńczonym wodą dejonizowaną, a następnie dodawano 5 µl aneksyny V (An V) sprzężonej z barwnikiem FITC, która wiąże się do fosfatydyloseryny, ulegającej ekspozycji na zewnętrznej warstwie błony komórki podczas procesu apoptozy (408). Ponadto, dodawano także 5 µl barwnika jądrowego 7-aminoaktynomycyny D (7-AAD), wykazującego zdolność do wnikania do obumierających komórek, które utraciły integralność błony komórkowej (409). Po 15 min. inkubacji komórek z odczynnikami w TP, komórki analizowano z zastosowaniem cytometru przepływowego BD LSRFortessa oraz oprogramowania BD FACSDiva wer. 8.1 (*Becton Dickinson)*. W analizie badano odsetek komórek żywych (AnV$^-$ 7-AAD$^-$), we wczesnej (AnV$^+$ 7-AAD$^-$) oraz późnej apoptozie (AnV$^+$7-AAD$^+$), a także komórek nekrotycznych (AnV$^-$ 7-AAD$^+$).

3.2.12. Test chemotaksji komórek CD34$^+$ w gradiencie SDF-1

Komórki CD34$^+$ poddane 7-dniowej ekspansji liczono, a następnie testowano ich zdolność do chemotaktycznej reakcji na gradient SDF-1, po uprzedniej inkubacji z hiPS-EVs (Rycina 13). W tym celu, $4 \cdot 10^5$ komórek inkubowano w pożywce z hiPS-EVs przez 2, 6 lub 24 godz., zgodnie z procedurą szczegółowo opisaną w Podrozdziale 3.2.5.2. pt. *Inkubacja krótkoterminowa*. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane

w pożywce bez dodatku hiPS-EVs. W danym punkcie czasowym niezwiązane hiPS-EVs odpłukiwano, a komórki zawieszano w 250 µl pożywki IMDM (*Sigma-Aldrich*) z dodatkiem 0,5 % BSA (*Sigma- Aldrich*). Wybór takiego składu pożywki podyktowany był koniecznością eliminacji ewentualnych czynników chemotaktycznych obecnych w pełnej pożywce, które mogłyby potencjalnie wpływać na reakcję komórek na SDF-1. Następnie, wysiewano komórki w liczbie $1{,}5 \cdot 10^5$ na zmodyfikowaną komorę Boydena, stanowiącą inserty z membraną o średnicy porów 5 µm (Transwell polycarbonate membrane cell culture inserts; *Corning*), umieszczone w studzienkach płytki 24-dołkowej, zawierających 650 µl pożywki IMDM z dodatkiem 0,5 % BSA oraz SDF-1 (100 ng/ml; *Peprotech*) lub w studzienkach z pożywką IMDM z 0,5 % BSA, ale bez dodatku chemoatraktanta (kontrola ujemna). Dodatkowo, wysiewano po $3 \cdot 10^5$ komórek do osobnych dołków bez insertu, stanowiących kontrolę ilościową testu.



Rycina 13. Uproszczony schemat analizy wpływu hiPS-EVs na zdolność komórek CD34$^+$ z KP do chemotaktycznej reakcji na gradent SDF-1 *in vitro*, z wykorzystaniem zmodyfikowanej komory Boydena.

Komórki inkubowano następnie przez 3 godz. w standardowych warunkach (37^o C, 5 % CO_2), po czym usuwano inserty, a komórki, które przemigrowały przez pory do studzienek zliczano za pomocą cytometru przepływowego BD LSRFortessa oraz oprogramowania BD FACSDiva wer. 8.1 (*Becton Dickinson*) (Rycina 13). Procent komórek aktywnych chemotaktycznie obliczano stosując wzory przedstawione na Rycinie 14.

Jednocześnie, $5 \cdot 10^4$ komórek bezpośrednio po inkubacji z hiPS-EVs barwiono mysimi przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko ludzkiemu antygenowi CXCR4 (klon 12G5; *BD Bioscience*), sprzężonymi z barwnikiem fluorescencyjnym PE-Cy7 i analizowano za pomocą cytometru przepływowego BD LSRFortessa (komórki barwiono według protokołu opisanego w Podrozdziale 3.2.9. pt. *Fenotypowanie komórek CD34$^+$ w trakcie ekspansji ex vivo*).

$$\%\ \text{komórek wykazujących chemotaksję} = \frac{(\text{liczba zliczeń } \textbf{próbki badanej} \text{ w czasie 20 sek}) \times 20\ \%}{\text{liczba zliczeń } \textbf{kontroli ilościowej} \text{ w czasie 20 sek}}$$

$$\%\ \text{komórek dla kontroli ujemnej} = \frac{(\text{liczba zliczeń } \textbf{kontroli ujemnej} \text{ w czasie 20 sek}) \times 20\ \%}{\text{liczba zliczeń } \textbf{kontroli ilościowej} \text{ w czasie 20 sek}}$$

$$\%\ \text{komórek o } \textbf{aktywnej} \text{ chemotaksji} = \%\ \text{komórek wykazujących chemotaksję} - \%\ \text{komórek dla kontroli ujemnej}$$

Rycina 14. Wzory stosowane w obliczeniach podczas analizy ilościowej aktywności chemotaktycznej komórek CD34$^+$ z KP w gradiencie SDF-1. Próbka badana: komórki wysiane na insert w dołku z pożywką zawierającą SDF-1; Kontrola ujemna: komórki wysiane na insert w dołku z pożywką bez SDF-1. Kontrola ilościowa: komórki wysiane na dołek bez insertu, w liczbie stanowiącej 20 % liczby komórek wysiewanych na inserty. Liczba zliczeń oznacza liczbę komórek zebraną w próbce przez cytometr w trakcie akwizycji.

3.2.13. Analiza zmian wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia w komórkach CD34$^+$ stymulowanych chemoatraktantem

W celu zbadania wpływu hiPS-EVs na zmianę stężenia jonów wapnia w komórkach stymulowanych za pomocą chemoatraktanta, $2 \cdot 10^5$ komórek CD34$^+$ poddanych uprzednio 7- dniowej ekspansji, inkubowano następnie w pożywce z hiPS-EVs przez 2 godz., 6 godz. lub 24 godz., zgodnie z procedurą szczegółowo opisaną w Podrozdziale 3.2.5.2. pt. *Inkubacja krótkoterminowa*. Kontrolę stanowiły komórki nieinkubowane z hiPS-EVs. Dodatkowo, 30 min przed końcem inkubacji z pęcherzykami, do zawiesiny komórek dodawano także barwnik Fluo-4 AM (*Thermo Fisher Scientific*) o końcowym stężeniu 1 µM. Barwnik ten ma zdolność do przenikania przez błonę komórkową oraz do akumulacji w cytoplazmie w wyniku modyfikacji za pomocą esteraz, a po związaniu z wolnymi jonami Ca^{2+} wykazuje zieloną fluorescencję po wzbudzeniu laserem niebieskim (410).
W odpowiednim punkcie czasowym niezwiązane hiPS-EVs oraz nadmiar barwnika odpłukiwano poprzez wirowanie (350 x *g*, 10 min, 4^o C), a komórki zawieszano w 200 µl pożywki IMDM (*Sigma-Aldrich*) z dodatkiem 0,5 % BSA (*Sigma-Aldrich*). Następnie, do zawiesiny komórkowej dodawano 200 µl pożywki IMDM zawierającej 200 ng/ml SDF-1, uzyskując w ten sposób końcowe stężenie tego chemoatraktanta wynoszące 100 ng/ml, czyli stężenie równe stosowanemu podczas testu chemotaksji. Natychmiast po dodaniu pożywki z SDF-1 mierzono sygnał zielonej fluorescencji przez czas 120 sek, za pomocą cytometru przepływowego BD LSRFortessa oraz oprogramowania BD FACSDiva wer. 8.1 (*Becton Dickinson*). Przed dodaniem SDF-1 do zawiesiny komórkowej, mierzono także bazalny poziom fluorescencji komórek (kontrola negatywna), uwzględniony następnie w strategii bramkowania podczas analizy.

3.2.14. Test adhezji komórek $CD34^+$ do fibronektyny *in vitro*

$2 \cdot 10^5$ komórek $CD34^+$ poddanych uprzednio 7- dniowej ekspansji, inkubowano z hiPS-EVs przez 2 godz., zgodnie z procedurą szczegółowo opisaną w Podrozdziale 3.2.5.2. pt. *Inkubacja krótkoterminowa*. Kontrolę stanowiły komórki nieinkubowane z hiPS-EVs. Dodatkowo, 30 min przed końcem inkubacji z pęcherzykami, do zawiesiny komórek dodawano odczynnik Vybrant Cell Adhesion Assay kit (*Thermo Fisher Scentific*), zawierający acetoksymetylokalceinę (kalceinę AM), której końcowe stężenie wynosiło 5 µM. Substancja ta, jako pochodna kalceiny, ma zdolność do przenikania przez błonę komórkową oraz wykazywania zielonej fluorecencji i akumulacji w cytoplazmie w wyniku jej modyfikacji za pomocą esteraz (411). Zastosowanie tego odczynnika miało na celu wybarwienie komórek $CD34^+$ w celu ich późniejszej detekcji za pomocą czytnika fluorescencyjnego.
Następnie, tak przygotowane próbki odpłukiwano poprzez wirowanie w roztworze PBS (350 x *g*, 10 min, 4ºC) w celu usunięcia niezwiązanych hiPS-EVs oraz nadmiaru kalceiny AM. Komórki zawieszano następnie w pożywce hodowlanej i wysiewano je na dołki czarnej płytki 96-dołkowej z przezroczystym dnem (*Corning*), dedykowane do pomiarów fluorescencji. Dołki te pokrywano uprzednio ludzką fibronektyną (*Sigma-Aldrich*), poprzez dodanie 100 µl jej wodnego roztworu (50 µg/ml), a następnie inkubację przez 1 godz. w TP i usunięcie cieczy. Na tak przygotowane płytki wysiewano komórki w liczbie $3 \cdot 10^5$ na dołek (w tryplikacie) w 100 µl pożywki i inkubowano je przez 2,5 godz. (37º C, 5 % CO_2), umożliwiając im adhezję do fibronektyny. Po czasie inkubacji niezaadherowane do podłoża komórki odpłukiwano dwukrotnie za pomocą 200 µl PBS. Następnie, sygnał zielonej fluorescencji pochodzącej od kalceiny obecnej w komórkach $CD34^+$ przyczepionych do dna studzienek mierzono za pomocą czytnika Infinite M200 Pro oraz oprogramowania i-control (*Tecan*), przy długości fali wzbudzenia 494 nm oraz emisji 517 nm. Każdorazowo, dokonywano odczytu sygnału z ośmiu punktów studzienki płytki, biorąc do dalszych obliczeń wartość uśrednioną. Dodatkowo, dla potwierdzenia otrzymanych wyników wykonywano zdjęcia zaadherowanych do podłoża komórek $CD34^+$ wybarwionych kalceiną AM, za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Leica DMI6000B wer. DMI7000 (*Leica Microsystems*). Zdjęcia komórek wykonywano z wykorzystaniem 10 x obiektywu oraz 14-bitowej kamery EM-CCD Hamamatsu 9100–02, kontrolowanej przez oprogramowanie Leica Application Suite Advanced Fluorescence Software (*Leica Microsystems*).

3.2.15. Test oceniający adhezję komórek $CD34^+$ do komórek mezenchymalnych oraz komórek śródbłonka naczyniowego *in vitro*

Test adhezji komórek $CD34^+$ po ich inkubacji z hiPS-EVs przeprowadzano analogicznie do testu adhezji do fibronektyny (opisanego w Podrozdziale 3.2.14. pt. *Test adhezji komórek $CD34^+$ do fibronektyny in vitro*), przy czym komórki $CD34^+$ wysiewano na uprzednio przygotowane płytki 96-dołkowe pokryte komórkami UC-MSCs lub HUVECs, o konfluencji 90-100 %.

W przypadku komórek UC-MSCs wysiewano je po pasażu w liczbie 10^4 komórek/dołek w 100 µl pożywki DMEM/F12 (*Sigma-Aldrich*) z dodatkiem 10 % FBS (*Thermo Fisher Scientific*), 24 godz. przed testem adhezji. W eksperymentach z adhezją do komórek HUVECs wysiewano je po pasażu w liczbie $2 \cdot 10^4$ komórek/dołek w 100 µl pożywki EGM-2MV (*Lonza*), 48 godz. przed testem adhezji. Każdorazowo, bezpośrednio przed wysianiem komórek $CD34^+$, usuwano pożywkę znad zaadherowanych komórek UC-MSCs lub HUVECs. Liczby wysianych komórek oraz czas ich hodowli dobrano tak, aby w momencie rozpoczęcia testu adhezji tworzyły one monowarstwę o konfluencji ok. 90%.
Równolegle do testu adhezji, $5 \cdot 10^4$ komórek $CD34^+$ bezpośrednio po ich inkubacji z hiPS-EVs (przed wysianiem na studzienki pokryte fibronektyną, komórkami UC-MSCs lub HUVECs) barwiono mysimi przeciwciałami monoklonalnymi przeciwko ludzkim molekułom adhezyjnym komórek HSCs, których spis zamieszczono w Tabeli 13. Komórki barwiono analogicznie do protokołu opisanego w Podrozdziale 3.2.9. pt. *Fenotypowanie komórek $CD34^+$ w trakcie ekspansji ex vivo*, a następnie analizowano za pomocą cytometru przepływowego BD LSRFortessa, mierząc poziom ekspresji badanych antygenów powierzchniowych.

Tabela 13. Spis przeciwciał stosowanych do analizy ekspresji molekuł adhezyjnych na komórkach $CD34^+$ z KP, poddanych działaniu hiPS-EVs.

Rozpoznawany antygen		Fluorochrom	Klon	Producent
Skrót nazwy	**Pełna nazwa**			
CD49d (VLA-4)	integryna α4 lub bardzo późny antygen 4 (ang. *very late antigen 4)*	BV421	9F10	*BioLegend*
(CD49e) VLA-5	integryna α5 lub bardzo późny antygen 5 (ang. *very late antigen 5)*	PE	NKI-SAM-1	
LFA-1	antygen związany z funkcją limfocytów 1 (ang. *lymphocyte function associated antygen 1)*	APC	m24	

3.2.16. Analiza zmian ekspresji genów w komórkach $CD34^+$ poddanych ekspansji *ex vivo*

Analizę wpływu hiPS-EVs na ekspresję wybranych genów w komórkach $CD34^+$ izolowanych z KP, prowadzono dla komórek poddanych działaniu pęcherzyków zarówno w systemie krótko- jak i dugoterminowej inkubacji.
W przypadku analizy w systemie krótkoterminowym, komórki $CD34^+$ poddawano inkubacji z hiPS-EVs przez 2, 6 lub 24 godz., zgodnie z protokołem opisanym w Podrozdziale 3.2.5.2. pt. *Inkubacja krótkoterminowa*. Po odpowiednim czasie

inkubacji, komórki zbierano z dołków płytki hodowlanej, odwirowywano (350 x *g*, 10 min, 4^{o} C), a następnie osady komórkowe przechowywano w -80^{o} C do czasu dalszych analiz. Następnie, osady te rozmrażano w 4^{o} C i izolowano z nich RNA za pomocą kitu GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (*Eurx*), zgodnie z protokołem producenta. W kolejnym etapie mierzono stężenie RNA przy użyciu nanospektrofotometru (*Implen*) i poddawano je reakcji odwrotnej transkrypcji, za pomocą odczynników TaqMan Reverse Transcription (*Thermo Fisher Scientific*), zgodnie z protokołem producenta. Do reakcji używano każdorazowo 300 ng RNA. Otrzymane w ten sposób cDNA poddawano reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative real time polymerase chain reaction;* qPCR), w celu analizy poziomu ekspresji mRNA dla badanych genów. Do reakcji używano kitu SG qPCR Master Mix (*Eurx*), zgodnie z protokołem producenta. Przed reakcją, do dołków płytki MicroAmp 96-well Base (*Thermo Fisher Scientific*) pipetowano po 25 µl mieszaniny reakcyjnej, zawierającej: 12,5 µl odczynnika SG qPCR Master Mix, po 1,5 µl każdego z pary starterów dla danego genu, 0,5 µl barwnika ROX oraz 2 µl cDNA. Każdorazowo, stosowano także próbki kontrolne o takim samym składzie mieszaniny reakcyjnej, lecz pozbawione cDNA. Analizie poddawano geny hematopoetyczne (SCL, HOXB4), antyapoptotyczny (BCL-2) oraz β-2-mikroglobulinę jako gen referencyjny (kontrola endogenna). Wszystkie startery zakupiono w firmie *Genomed*, a do reakcji qPCR stosowano ich wodne roztwory o stężeniu 5 µM. Spis stosowanych starterów zamieszczono w Tabeli 14.

Następnie, płytki pokrywano folią MicroAmp Optical Adhesive Film (*Thermo Fisher Scientific*) i umieszczano w termocyklerze 7500 Fast Real-Time PCR System (*Thermo Fisher Scientific*), w którym prowadzono reakcję qPCR, stosując warunki zalecane przez producenta zestawu SG qPCR Master Mix. Monitorowano jednocześnie krzywe topnienia powstałych produktów, świadczące o specyficzności reakcji i zastosowanych starterów. Po zakończonej reakcji odczytywano generowane przez aparat wartości parametru C_T (z ang. *treshold cycle*) dla każdego dołka płytki, które wykorzystywano następnie do analizy ilościowej transkryptów dla badanych genów.

Za pomocą metody $\Delta\Delta C_T$ (412) obliczano względny poziom ekspresji badanych genów, znormalizowany względem kontroli endogennej, wyrażony jako $2^{-\Delta\Delta CT}$, gdzie ΔC_T = (C_T dla badanego genu) – (C_T dla kontroli endogennej), a $\Delta\Delta C_T$ = (ΔC_T dla próbki badanej) – (ΔC_T dla kalibratora), przy czym próbkę badaną stanowiły komórki poddane działaniu hiPS-EVs, a kalibrator stanowiły komórki kontrolne, niepoddane działaniu hiPS-EVs. Tym samym, zastosowanie tej metody umożliwiło wyznaczenie krotności zmiany ($2^{-\Delta\Delta CT}$) poziomu ekspresji poszczególnych mRNA w próbkach z komórek inkubowanych z pęcherzykami, w porównaniu do komórek kontrolnych, dla których, na podstawie powyższego równania, poziom ekspresji poszczególnych genów przyjmował wartość 1.

Tabela 14. Spis sekwencji starterów stosowanych w analizie wpływu krótkoterminowej inkubacji z hiPS-EVs na poziom ekspresji wybranych genów w komórkach CD34$^+$ izolowanych z KP, z zastosowaniem metody qPCR. F: starter forward, R: starter reverse.

Gen	Sekwencja startera
β2-mikroglobulina	(F) AATGCGGCATCTTCAAAC (R) TGACTTTGTCACAGCCCAAGATA
SCL	(F) GGCTTTGTGTGAAGGCAGAGA (R) TCGCCAGCATGAACAGTGAT
HOXB4	(F) CCGATACCCAGCGAAAGC (R) TCAGTGAATGGGCACGAAAGA
BCL-2	(F) GAGTGACAGTGGATTGCAT (R) CAGAATATCAGCCACCTCTT

Z kolei, w analizie długoterminowej inkubacji, komórki CD34$^+$ poddawano ekspansji *ex vivo* w pożywce z dodatkiem hiPS-EVs, zgodnie z protokołem opisanym w Podrozdziale 3.2.5.1. pt. *Inkubacja długoterminowa*. W 4 oraz 8 dniu hodowli, komórki zbierano z dołków płytki hodowlanej, odwirowywano (350 x *g*, 10 min, 4^o C), a następnie osady komórkowe przechowywano w -80^o C do czasu dalszych analiz. Dodatkowo, zabezpieczano także część komórek bezpośrednio po ich izolacji z KP. Następnie, osady komórek rozmrażano w 4^o C i izolowano z nich RNA za pomocą kitu GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit (*Eurx*), zgodnie z protokołem producenta. Po pomiarze stężenia RNA przy użyciu nanospektrofotometru (*Implen*) poddawano je reakcji odwrotnej transkrypcji, za pomocą odczynników TaqMan Reverse Transcription (*Thermo Fisher Scientific*). Do reakcji używano każdorazowo 300 ng RNA. Otrzymane w ten sposób cDNA poddawano reakcji qPCR w celu analizy poziomu ekspresji mRNA dla badanych genów, wykorzystując komercyjnie dostępne zestawy Hematopoiesis RT^2 Profiler PCR Array (*Qiagen*), zawierające specyficzne startery rozpoznające 84 geny związane z procesem hematopoezy, wraz z odpowiednimi kontrolami testu oraz genami referencyjnymi (kontrole endogenne). Do reakcji używano kitu SYBR Green qPCR Master Mix (*Thermo Fisher Scientific*), zgodnie z protokołem producenta, oraz instrumentu QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (*Thermo Fisher Scientific*). Zastosowano warunki reakcji zgodne z wytycznymi producenta zestawów Hematopoiesis RT^2 Profiler PCR Array. Eksperyment przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach, bazujących na trzech izolacjach komórek CD34$^+$ z jednostek KP, poddanych następnie ekspansji *ex vivo*.

Na podstawie wstępnej analizy wyników, wybrano 50 mRNA (Tabela 15), dla których we wszystkich badanych próbkach udało się otrzymać amplifikację produktu w reakcji qPCR na poziomie powyżej punktu odcięcia (z ang. *treshold*), wyznaczonego automatycznie przez termocykler. Poziom ekspresji wyselekcjonowanych w ten sposób transkryptów poddawano następnie dalszej analizie, wykorzystując β-2-mikroglobulinę jako gen referencyjny. Za pomocą metody $\Delta\Delta C_T$ obliczano krotność zmiany poziomu ekspresji mRNA w komórkach CD34$^+$ namnażanych *ex vivo* w pożywce bez lub z dodatkiem hiPS-EVs, w porównaniu do poziomu dla komórek bezpośrednio po izolacji. Ponadto, w dalszej analizie porównywano również stosunek krotności zmiany

ekspresji poszczególnych genów w komórkach namnażanych w pożywce z hiPS-EVs, w porównaniu do komórek poddawanych ekspansji w pożywce kontrolnej.
Względny poziom analizowanych genów zwizualizowano w postaci obrazu typu *heatmap*, wygenerowanego za pomocą narzędzia *Heatmapper*, dostępnego na stronie http://www.heatmapper.ca. Dodatkowo, powiązanie funkcjonalne pomiędzy wybranymi grupami genów ulegających różnicowej ekspresji opracowano na podstawie narzędzia bioinformatycznego *NetworkAnalyst*, dostępnego na stronie http://www.networkanalyst.ca, które umożliwia graficzną wizualizację oraz analizę interakcji pomiędzy cząstkami biologicznymi. W sugerowanych ustawieniach analizy narzędzie zaimplementowało bazę danych *STRING Interactom*, z poziomem odcięcia (z ang. *confidence score cutoff*) równym 900.

Tabela 15. Spis genów poddanych analizie poziomu ich ekspresji w komórkach $CD34^+$ z KP, namnażanych *ex vivo* w pożywce z dodatkiem hiPS-EVs, z zastosowaniem zestawów Hematopoiesis RT^2 Profiler PCR Array. W tabeli podano nazwy genów, zgodnie z danymi dostarczonymi przez producenta, stosowane w dalszej części pracy, wraz z pełnymi nazwami w języku angielskim i polskim (o ile występują).

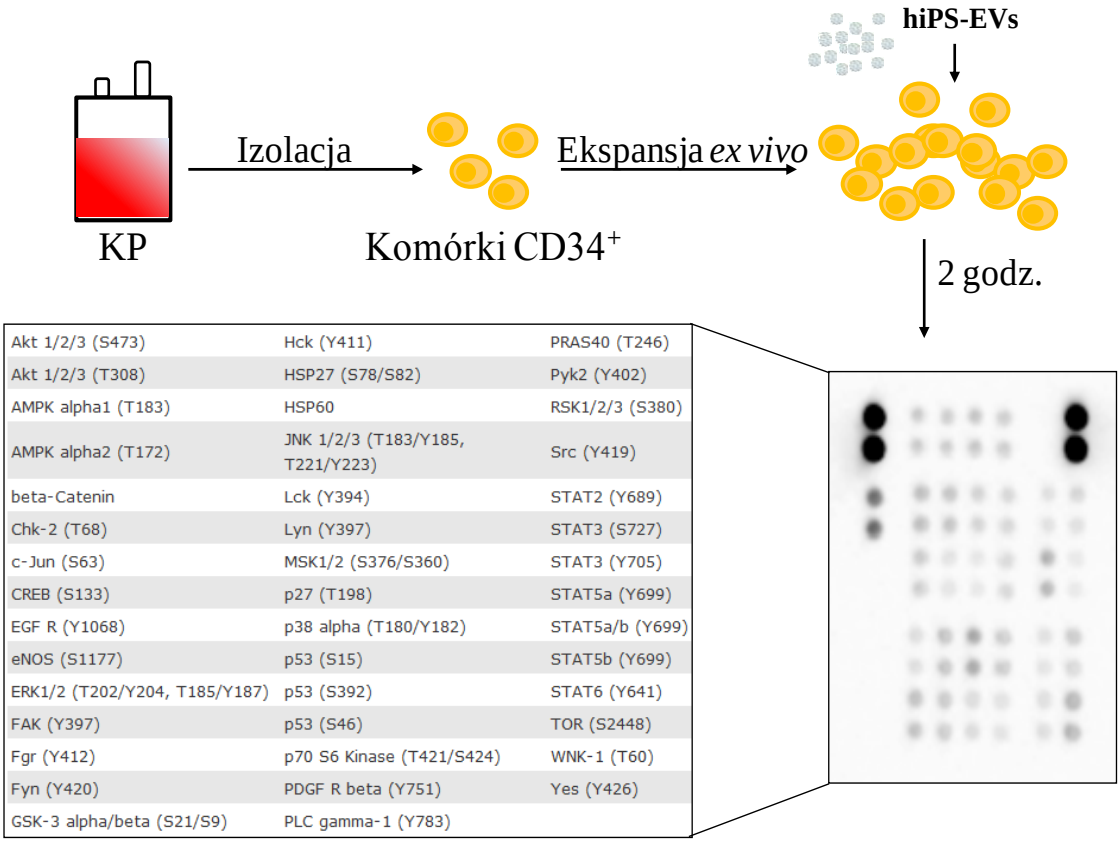
Nazwa genu	Pełna nazwa angielska	Pełna nazwa polska
IL6ST	Interleukin 6 signal transducer (gp130)	Białko przekazujące sygnał od interleukiny 6
CD3D	CD3 δ (CD3-TCR complex)	CD3 δ (kompleks CD3-TCR)
KIT	V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	Homolog wirusowego onkogenu psiego mięsaka V-kit Hardy-Zuckermana 4
JAG1	Jagged 1	Jagged 1
LRMP	Lymphoid-restricted membrane protein	Limfoidalne białko błonowe
VAV1	Vav 1 guanine nucleotide exchange factor	Czynnik wymiany nukleotydu guaninowego Vav1
CD27	CD27	CD27
RBPJ	Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region	Białko wiążące sygnału rekombinacji dla rejonu immunoglobuliny kappa J
ANGPT1	Angiopoietin 1	Angiopoetyna 1
CBFB	Core-binding factor β subunit	Podjednostka β czynnika CBF

CEBPG	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), γ	Białko wiążące wzmacniacz CCAAT(C/EBP), γ
INHBA	Inhibin α	Inhibina α
TNFSF11	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11	Ligand 11 superrodziny czynnika wzrostu nowotworu
ETV6	Ets variant 6	Ets wariant 6
NCOA6	Nuclear receptor coactivator 6	Koaktywator receptora jądrowego 6
CD164	CD164	CD164
PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule	Cząsteczka adhezji płytek/śródbłonka 1
IL31RA	Interleukin 31 receptor A	Receptor A interleukiny 31
LEF1	Lymphoid enhancer-binding factor 1	Czynnik transkrycyjny LEF1
ASH2L	Ash2 (absent, small, or homeotic)-like (Drosophila)	-
GATA2	GATA binding protein 2	Biako wiążące GATA 2
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	Czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego A
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1	Białko przekazujące sygnał i aktywujące transkrypcję 1
GATA1	GATA binding protein 1	Biako wiążące GATA 1
CEBPE	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), ε	Białko wiążące wzmacniacz CCAAT(C/EBP), ε
CD34	CD34	CD34
FZD1	Frizzled family receptor 1	Receptor rodziny Frizzled 1
HDAC7	Histone deacetylase 7	Deacetylaza histonowa 7
HDAC9	Histone deacetylase 9	Deacetylaza histonowa 9
CD44	CD44	CD44

STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	Białko przekazujące sygnał i aktywujące transkrypcję 3
TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1	Białko ostrej białaczki limfocytarnej 1
PTPRC	Protein tyrosine phosphatase, receptor type C	Receptor C fosfatazy tyrozynowej
CHST15	Carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-O) sulfotransferase 15	Sylfotransferaza 15
RUNX1	Runt-related transcription factor 1	Czynnik transkrypcyjny związany z Runt 1
MAP4K1	Mitogen-activated protein kinase 1	Kinaza aktywowana mitogenem 1
SFXN1	Sideroflexin 1	Suderofleksyna 1
HDAC5	Histone deacetylase 5	Deacetylaza histonowa 5
CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	Czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytarno-makrofagowych
LMO2	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)	Domena LIM 2 (typu rombotyny 1)
CCR1	Chemokine (C-C motif) receptor 1	Receptor chemokinowy 1
ETS1	V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1	Homolog 1 onkogenu wirusa E26
CD14	CD14	CD14
HDAC4	Histone deacetylase 4	Deacetylaza histonowa 4
NOTCH1	NOTCH1	NOTCH1
NOTCH2	NOTCH2	NOTCH2
FUT10	Fucosyltransferase 10	Fukozylotransferaza 10
TLR4	Toll-like receptor 4	Toll-podobny receptor 4
IL12B	Interleukin 12B	Interleukina 12B
PAX5	Paired box 5	-

3.2.17. Analiza zmian fosforylacji kinaz białkowych w komórkach CD34$^+$

$1 \cdot 10^6$ komórek CD34$^+$ po 7 dniach ekspansji *ex vivo*, poddawano inkubacji z hiPS-EVs przez 2 godz., zgodnie z procedurą szczegółowo opisaną w Podrozdziale 3.2.5.2. pt. *Inkubacja krótkoterminowa*. Kontrolę stanowiły komórki nieinkubowane z hiPS-EVs. Następnie, niezwiązane pęcherzyki odpłukiwano poprzez wirowanie komórek (300 x *g*, 10 min, TP), a osady komórkowe poddawano analizie zmian stopnia fosforylacji reszt aminokwasowych wybranych kinaz białkowych, z wykorzystaniem zestawu Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array (*R&D Systems*). Zestaw ten zawiera macierze białkowe wraz z niezbędnymi odczynnikami, pozwalające na jednoczesną detekcję zmian poziomu 44 różnych fosforylacji białek (Rycina 15, Tabela 16).



Akt 1/2/3 (S473)	Hck (Y411)	PRAS40 (T246)
Akt 1/2/3 (T308)	HSP27 (S78/S82)	Pyk2 (Y402)
AMPK alpha1 (T183)	HSP60	RSK1/2/3 (S380)
AMPK alpha2 (T172)	JNK 1/2/3 (T183/Y185, T221/Y223)	Src (Y419)
beta-Catenin	Lck (Y394)	STAT2 (Y689)
Chk-2 (T68)	Lyn (Y397)	STAT3 (S727)
c-Jun (S63)	MSK1/2 (S376/S360)	STAT3 (Y705)
CREB (S133)	p27 (T198)	STAT5a (Y699)
EGF R (Y1068)	p38 alpha (T180/Y182)	STAT5a/b (Y699)
eNOS (S1177)	p53 (S15)	STAT5b (Y699)
ERK1/2 (T202/Y204, T185/Y187)	p53 (S392)	STAT6 (Y641)
FAK (Y397)	p53 (S46)	TOR (S2448)
Fgr (Y412)	p70 S6 Kinase (T421/S424)	WNK-1 (T60)
Fyn (Y420)	PDGF R beta (Y751)	Yes (Y426)
GSK-3 alpha/beta (S21/S9)	PLC gamma-1 (Y783)	

Rycina 15. Schemat analizy zmian fosforylacji kinaz białkowych w komórkach CD34$^+$ poddanych działaniu hiPS-EVs. W eksperymencie wykorzystano macierze białkowe Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array (*R&D Systems*), pozwalające na jednoczesną detekcję zmian poziomu 44 różnych fosforylacji białek, wymienionych w tabelce. W ramce zaprezentowano przykładowy obraz membrany uzyskany po zczytaniu sygnałów chemiluminescencji. Tabelka pochodzi ze strony internetowej producenta www.rndsystems.com.

Analizę przeprowadzano zgodnie z protokołem producenta. W skrócie, osady komórek CD34$^+$ poddawano lizie za pomocą dedykowanego buforu lizującego, a następnie pobierano po 400 µg białka z otrzymanych w ten sposób lizatów (stężenie białka w próbkach wyznaczono na podstawie pomiaru metodą Bradforda, analogicznie do

protokołu szczegółowo opisanego w Podrozdziale 3.2.4.1. pt. *Pomiar stężenia białka w próbkach hiPS-EVs*). Próbki białkowe inkubowano przez noc w 4^{o} C z membranami nitrocelulozowymi, pokrytymi duplikatami obszarów ze związanymi przeciwciałami, rozpoznającymi ufosforylowane formy kinaz. W kolejnym etapie membrany odpłukiwano buforem płuczącym i poddawano inkubacji z odpowiednimi biotynylowanymi przeciwciałami detekcyjnymi, a następnie z enzymem HRP (ang. *horseradish peroxidase*) sprzężonym ze streptawidyną. Po dodaniu odpowiedniego substratu dla HRP, sygnał chemiluminescencyjny z macierzy był mierzony za pomocą czytnika MicroChemi (*DNR Bio-Imaging Systems*). Analiza densytometryczna zarejestrowanych sygnałów była następnie wykonywana za pomocą oprogramowania Quantity One (*Bio-Rad*). Zmiany poziomu ufosforylowanych form białek porównywano pomiędzy komórkami kontrolnymi (dla których poziom fosforylacji przyjęto jako wartość 1), a komórkami inkubowanymi z hiPS-EVs.

Dodatkowo, otrzymane wyniki analizowano także z zastosowaniem narzędzia bioinformatycznego PANTHER (*Protein Analysis Through Evolutionary Relationships*) Pathway Classification System wer. 13.1, dostępnego na stronie http://www.pantherdb.org, w trybie PANTHER Pathway Overrepresentation Test. Pozwala on na wysokoprzepustową klasyfikację białek zgodnie z ich udziałem w poszczególnych szlakach sygnałowania, określonych jako *PANTHER Pathways*. Do analizy wzięto te białka, których krotność zmiany poziomu formy fosforylowanej była $\geq$ 1,5 w komórkach CD34^{+} traktowanych hiPS-EVs, w porównaniu do poziomu dla komórek kontrolnych.
Ponadto, te same białka analizowano również za pomocą narzędzia STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) wer. 10.5, dostępnego na stronie https://string-db.org/. Stanowi ono bazę danych, służącą do analizy typu i stopnia interakcji pomiędzy białkami. Analizę przeprowadzono w trybie '*Molecular action*', który określa rodzaj oddziaływania pomiędzy białkami.

Tabela 16. Spis białek, których reszty aminokwasowe badano pod kątem ich fosforylacji w komórkach CD34^{+} poddanych działaniu hiPS-EVs, z wykorzystaniem zestawu Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array. W tabeli podano nazwy skrótowe białek (lub grup białek w przypadku wystąpienia kilku wariantów w obrebie tej samej rodziny białek), stosowane w dalszej części pracy. Nazwy skrótowe białek podano zgodnie z danymi dostarczonymi przez producenta macierzy. W nawiasach wskazano alternatywną nazwę białka z bazy Uniprot (https://www.uniprot.org), użytą podczas analizy z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych PANTHER oraz STRING.

Skrót nazwy białka (lub grupy białek)	Pełna nazwa angielska	Pełna nazwa polska
HSP60	Heat shock protein	Białko szoku cieplnego
WNK1	Serine/threonine-protein kinase Wnk1	Kinaza serynowo-treoninowa Wnk

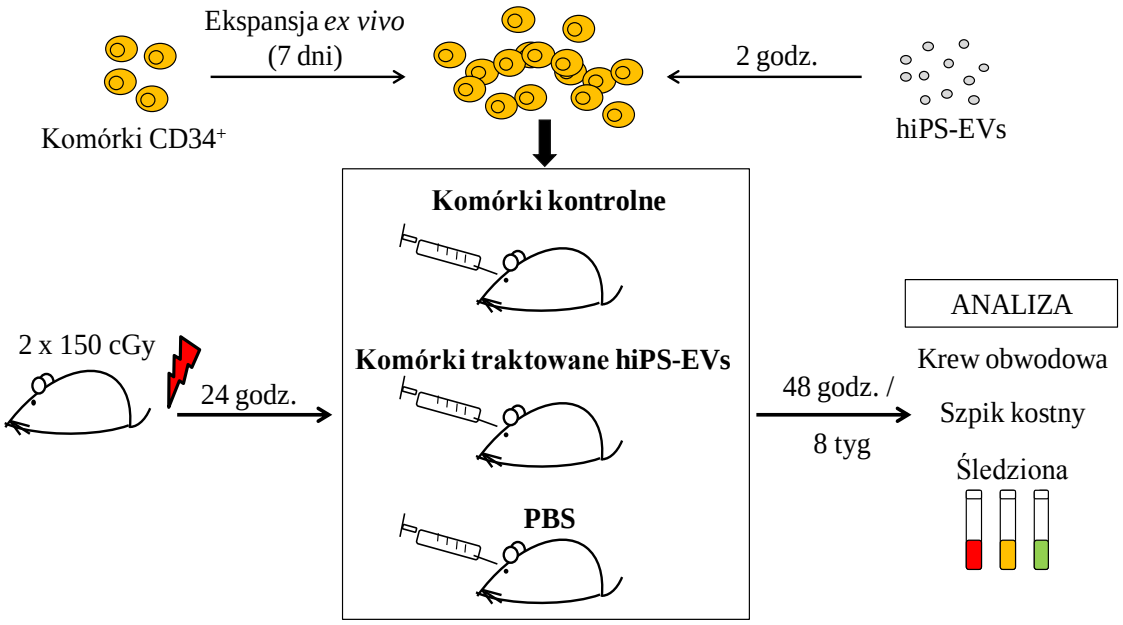
Akt	Serine/threonine-protein kinase Akt	Kinaza serynowo-treoninowa Akt
STAT	Signal transducer and activator of transcription proteins	Białka przekazujące sygnał i aktywujące transkrypcję
RSK	Ribosomal S6 kinase	Białko rybosomalne S6
p53	Cellular tumor antigen p53	Antygen nowotworowy p53
p70 S6	Ribosomal protein S6 kinase β-1	Kinaza β-1 białka rybosomalnego S6
c-Jun	Transcription factor AP-1	Czynnik transkrypcyjny AP-1
PLCγ1	Phospholipase Cγ1	Fosfolipaza Cγ1
Pyk2	Protein-tyrosine kinase 2- β	Tyrozynowa kinaza białkowa 2- β
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase	Śródbłonkowa syntaza tlenku azotu
TOR (MTOR)	Mammalian target of rapamycin	Ssaczy cel rapamycyny
Lyn	Tyrosine-protein kinase Lyn	Kinaza tyrozynowa Lyn
PRAS40	Proline-rich Akt substrate of 40 kDa	Bogaty w prolinę substrat dla kinazy Akt o masie 40 kDA
Yes (YES1)	Tyrosine-protein kinase Yes	Kinaza tyrozynowa Yes
Src	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	Kinaza tyrozynowa Src
Lck	Lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase	Kinaza tyrozynowa specyficzna dla limfocytów
Fyn	Tyrosine-protein kinase Fyn	Kinaza tyrozynowa Fyn

CREB (CREB1)	Cyclic AMP response element binding protein	Białko wiążące odpowiedzi na cykliczny adenozynomonofosforan
Chk-2 (CHEK2)	Checkpoint kinase 2	Kinaza punktu kontrolnego 2
Hck	Tyrosine-protein kinase Hck	Kinaza tyrozynowa Hck
Fgr	Tyrosine-protein kinase Fgr	Kinaza tyrozynowa Fgr
PDGFRb	Platelet-derived growth factor receptor β	Receptor β dla płytkowego czynnika wzrostu
FAK (PTK2)	Focal adhesion kinase	Kinaza kontaktów zogniskowanych
CTNNB1	β-catenin	β-katenina
MSK (RPS6KA5)	Mitogen and stress-activated protein kinase	Kinaza aktywowana mitogenem lub czynnikiem stresowym
ERK (MAPK3)	Extracellular signal regulated kinase	Kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym
EGFR	Epidermal growth factor receptor	Czynnik wzrostu naskórka
p38α(MAPK14)	Mitogen-activated protein kinase 14	Kinaza aktywowana mitogenem 14
AMPK (PRKAA)	5'-AMP-activated protein kinase	Kinaza aktywowana 5’-AMP
JNK (MAPK8)	Mitogen-activated protein kinase 8	Kinaza aktywowana miogenem 8
GSK-3ab	Glycogen synthase kinase 3ab	Kinaza syntazy glikogenu 3ab

3.2.18. Analiza zasiedlania nisz hematopoetycznych oraz chimeryzmu *in vivo* po przeszczepie komórek CD34$^+$ z KP

W eksperymencie oceniano wpływ hiPS-EVs na zdolność namnożonych *ex vivo* komórek CD34$^+$ z KP do rekonstytucji układu krwiotwórczego *in vivo* (Rycina 16). W tym celu, zastosowano dwa punkty czasowe analizy tkanek, pobieranych od myszy szczepu NOD/SCID po przeszczepieniu im ludzkich komórek CD34$^+$ z KP, uprzednio poddanych 2 godz. inkubacji z hiPS-EVs (zgodnie z protokołem szczegółowo opisanym w Podrozdziale 3.2.5.2. pt. *Inkubacja krótkoterminowa*).

Pierwszy punkt czasowy obejmował analizę materiału biologicznego 48 godz. od przeszczepu i miał na celu zbadanie efektywności zasiedlania nisz hematopoetycznych (z ang. *homing*) przez komórki CD34$^+$ z KP.
Drugi punkt czasowy stanowiła analogiczna analiza tkanek myszy, przeprowadzona 8 tygodni od przeszczepu, której rezultaty wskazywały na zdolność komórek CD34$^+$ z KP do wbudowania się (z ang. *engraftment*) i podjęcia procesów hematopoezy, prowadzących do powstania chimeryzu szpikowego.
Wszystkie procedury na zwierzętach były przeprowadzane na podstawie zgody wydanej przez II Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Badań na Zwierzętach w Krakowie.



Rycina 16. Uproszczony schemat analizy wpływu hiPS-EVs na zdolność namnożonych *ex vivo* komórek CD34$^+$ z KP do zasiedlania nisz hematopoetycznych oraz rekonstytucji układu krwiotwórczego *in vivo*, z zastosowaniem modelu myszy NOD/SCID poddanych radiacyjnej mieloablacji.

3.2.18.1. Zwierzęta

W eksperymencie *in vivo* wykorzystano myszy NOD/SCID, który jako szczep myszy z upośledzonym układem odpornościowym, jest powszechnie stosowanym modelem zwierzęcym w eksperymentach wymagających przeszczepienia ludzkich komórek bez ryzyka ich odrzutu (413, 414). Myszy obojga płci (w stosunku liczbowym 1:1) w momencie włączenia do eksperymentu posiadały wiek 8-10 tygodni. Na 24 godz. przed przeszczepieniem komórek $CD34^+$, myszy dwukrotnie naświetlano dawką promieniowania γ w dawce 100 cGy w odstępach 4-godz. (całkowita dawka promieniowania wynosiła 200 cGy).

3.2.18.2. Przygotowanie i przeszczep komórek

Komórki $CD34^+$ uprzednio ekspandowane *ex vivo* przez 7 dni, inkubowano z hiPS-EVs przez 2 godz., zgodnie z procedurą szczegółowo opisaną w Podrozdziale 3.2.5.2. pt. *Inkubacja krótkoterminowa.* Kontrolę stanowiły komórki nieinkubowane z hiPS-EVs. Po odpłukaniu niezwiązanych hiPS-EVs komórki zawieszano w PBS i przeszczepiono do napromieniowanych myszy poprzez wstrzyknięcie do splotu oczodołowego ($2 \cdot 10^5$ komórek na mysz w 100 µl PBS). Napromieniowane zwierzęta, którym podawano jedynie nośnik (PBS) stanowiły kontrolę negatywną eksperymentu.

3.2.18.3. Preparatyka tkanek

48 godz. lub 8 tygodni po przeszczepie myszy usypiano, a następnie pobierano od nich tkanki i organy będące naturalnym rezerwuarem komórek krwiotwórczych u myszy, w tym SzK, krew obwodową oraz śledzionę (415). SzK izolowano poprzez wypłukiwanie go z kości udowych oraz podudzia za pomocą strzykawki insulinowej (*Polfa*) do szalek hodowlanych z pożywką DMEM/F12 (*Sigma-Aldrich*). Komórki śledziony były izolowane poprzez rozdrobnienie organów na filtrze sitkowym o średnicy porów 70 µm (*Falcon*), zwilżonym pożywką DMEM/F12. Zawiesiny komórek SzK i śledziony odwirowywano (350 x *g*, 10 min, TP), a następnie zawieszano w 1 ml buforu BD Pharm Lyse (*BD Pharmingen*) i lizowano jednokrotnie w probówkach 15 ml typu falcon (*Sarstedt*) przez 8 min. w celu usunięcia erytrocytów. Po tym czasie probówki dopełniano pożywką DMEM/F12 i ponownie odwirowywano (350 x *g*, 10 min, TP), usuwając otrzymany nadsącz.
Krew obdwodową lizowano dwukrotnie w probówkach 15 ml typu falcon (*Sarstedt*), analogicznie do procedury stosowanej w przypadku lizy KP, szczegółowo opisanej w Podrozdziale 3.2.1.2. pt. *Liza erytrocytów*.
Po lizie komórki jądrzaste każdego typu tkanki zawieszano w 200 µl pożywki DMEM/F12 z dodatkiem 2 % FBS (*Sigma-Aldrich*). Dodatkowo, komórki SzK oraz śledziony liczono indywidualnie dla każdej myszy za pomocą komory Bűrkera.

3.2.18.4. Analiza cytometryczna

Komórki jądrzaste SzK, śledziony oraz krwi obwodowej barwiono przeciwciałami skierowanymi przeciwko ludzkiemu antygenowi panhematopoetycznemu CD45, skoniugowanymi z barwnikiem fluorescencyjnym BV421 (klon HI30; *BD Bioscience*), zgodnie z zaleceniami producenta. Dodatkowo, w celu poprawnego ustawienia strategii bramkowania podczas późniejszej analizy cytometrycznej, przygotowano także próbkę kontrolną, stosując barwienie odpowiednią kontrolą izotypową (mysie IgG1, skoniugowane z barwnikiem BV421; *BD Bioscience*). Na 5 min przed dodaniem przeciwciała anty-CD45 lub kontroli izotypowej, komórki inkubowano także z kontrolnymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko mysiemu antygenowi CD16/CD32 (*BD Bioscience*), aby zablokować niespecyficzne wiązanie przeciwciał anty-CD45 z receptorami dla końców Fc obecnymi na mysich komórkach. Próbki barwiono 20 min w 4^{o} C, odpłukiwano niezwiązane przeciwciała w PBS, odwirowywano (350 x g, 10 min, TP), a następnie tuż przed analizą cytometryczną dodawano do nich 7-AAD (*BD Bioscience*) w objętości rekomendowanej przez producenta. Obecność żywych ($7AAD^{-}$) ludzkich hematopoetycznych ($hCD45^{+}$) komórek w mysich tkankach analizowano za pomocą cytometru przepływowego LSR Fortessa oraz oprogramowania BD FACSDiva wer. 8.1 (*Becton Dickinson*). W strategii analizy oprócz kontrolnych próbek niebarwionych i barwionych kontrolą izotypową, uwzględniano także poziom tła dla próbek materiału pochodzącego od myszy, którym podano PBS bez komórek.

3.2.18.5. Test klonogenności

Komórki jądrzaste wyizolowane ze SzK myszy wysiewano w liczbie $2 \cdot 10^{6}$ w 700 µl pożywki Human Methylcelulose Enriched Media (*R&D Systems*), przeprowadzając test CFC według protokołu opisanego w Podrozdziale 3.2.10. pt. *Test potencjału klonogennego komórek CD34*$^{+}$. Po 14 dniach hodowli liczono kolonie hematopoetyczne, które powstały z przeszczepionych ludzkich komórek krwiotwórczych, znajdujących się w mysim SzK. Oprócz SzK pochodzącego od myszy, którym przeszczepiano komórki kontrolne lub traktowane hiPS-EVs, test CFC przeprowadzano także dla myszy, którym podawano PBS bez komórek. Kontrola ta miała na celu eliminację ryzyka uzyskania kolonii hematopoetycznych pochodzących od mysich komórek, w wyniku możliwej niespecyficznej aktywacji tych komórek przez ludzkie cytokiny obecne w pożywce Human Methylcelulose Enriched Media. Jednakże, przeprowadzony test nie wykazał obecności kolonii hematopoetycznych powstałych z komórek obecnych w tych próbkach kontrolnych.

3.2.19. Analiza statystyczna danych

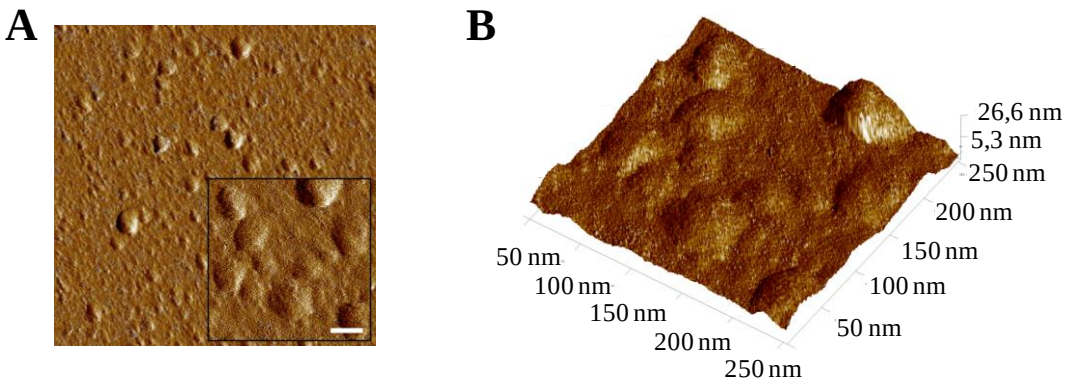
O ile nie wskazano inaczej, wszystkie doświadczenia przeprowadzono w minimum trzech niezależnych powtórzeniach, przy czym każde powtórzenie wykonywano na komórkach wyizolowanych z trzech jednostek KP. Liczbę powtórzeń każdego typu eksperymentu (N) podano przy opisie rycin z wynikami, zamieszczonych w Rozdziale 4 pt. *Wyniki*. O ile nie wskazano inaczej, dane liczbowe wyrażano jako średnią ± odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*; SD).
Uzyskane wyniki wyrażano jako wykresy rozproszenia (ang. *scatter plots*), gdzie każdy z punktów oznaczał daną dla pojedynczego powtórzenia eksperymentu, a linia pozioma wyznaczała wartość średnią dla wszystkich powtórzeń. Dodatkowo, część wyników zaprezentowano jako wykresy kolumnowe z wartością średniej oraz słupkami błędu odpowiadającym SD. O wyborze sposobu prezentacji danych decydował stopień rozrzutu wyników pomiędzy poszczególnym powtórzeniami eksperymentu. Do przygotowania stosownych wykresów z danymi liczbowymi zastosowano oprogramowanie GraphPad Prism ver.5 (*GraphPad Software*).
Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzano za pomocą oprogramowania Statistica ver. 13 (*StatSoft*). W przypadku eksperymentów, w których wyniki przedstawiano jako krotność zmiany w porównaniu do kontroli lub jako % kontroli, stosowano test *t* dla pojedynczej próby ze stałą wartością odniesienia równą odpowiednio 1 lub 100%. W pozostałych eksperymentach stosowano test *t* Studenta. Wyniki, dla których wartość parametru p była mniejsza od 0,05 ($p<0,05$) uznawano za istotne statystycznie i oznaczano na wykresach symbolem „*”.

4. WYNIKI

4.1. Analiza morfologii oraz fenotypu hiPS-EVs

Przed przystąpieniem do analizy wpływu hiPS-EVs na właściwości biologiczne komórek $CD34^+$ z KP, w pierwszym etapie badań przeprowadzono analizę ilościową i jakościową próbek hiPS-EVs, zgodnie z wytycznymi rekomendowanymi przez Międzynarodowe Towarzystwo zajmujące się badaniami nad EVs (*International Society of Extracellular Vesicles*; ISEV) (416). Próbki te otrzymywano w naszym laboratorium z pożywki kondycjonowanej z hodowli komórek hiPS, na drodze sekwencyjnego wirowania z etapem ultrawirowania, zgodnie z protokołem izolacji opublikowanym przez nasz zespół badawczy (396).

W pierwszej kolejności zbadano morfologię obiektów obecnych w otrzymanych próbkach hiPS-EVs. W tym celu wykorzystano obrazowanie z zastosowaniem mikroskopii sił atomowych, które potwierdziło obecność kulistych, integralnych pęcherzyków w badanych preparatach (Rycina 17).

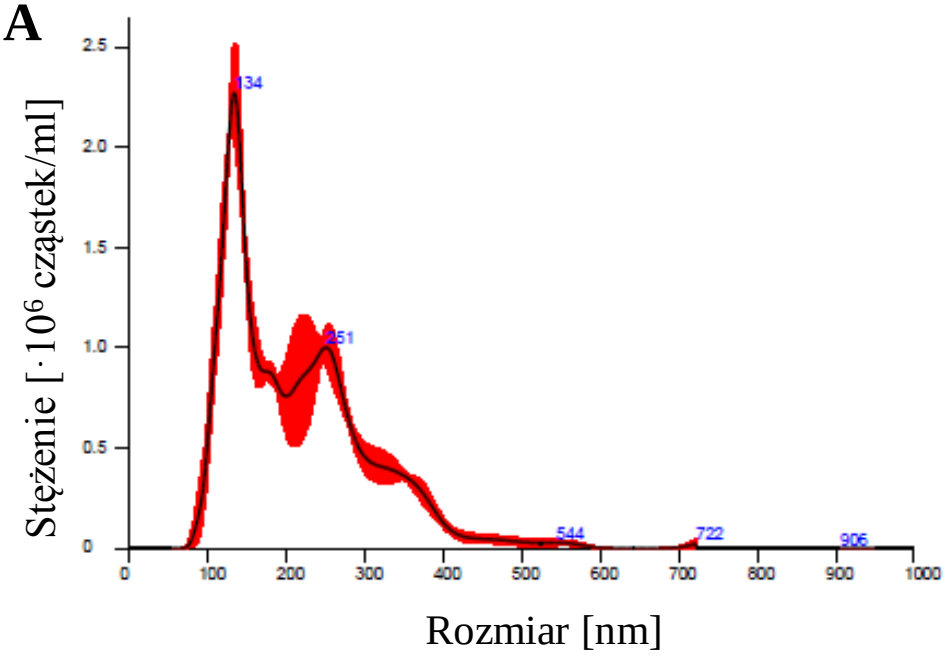


Rycina 17. Analiza morfologii hiPS-EVs. Reprezentatywne obrazy struktur pęcherzykowych, uzyskane z zastosowaniem mikroskopu sił atomowych (AFM) Bioscope Catalyst (*Bruker*) w trybie odczytu Peak Force Tapping. **A:** Przykładowe zdjęcie próbki hiPS-EVs w projekcji 2-wymiarowej, wraz z obszarem powiększonym, gdzie pasek skali oznacza 50 nm. **B:** Przykładowe zdjęcie topografii pęcherzyków w projekcji 3-wymiarowej, z obszarem skanu 250 x 250 nm.

Ponadto, przeprowadzono szczegółową analizę rozkładu wielkościowego cząstek w próbkach hiPS-EVs, wykorzystując w tym celu technikę NTA. Otrzymane wyniki wskazują, że średnia wielkość (średnica hydrodynamiczna) obiektów obecnych w badanych preparatach hiPS-EVs wynosi 215,73 ± 7,18 nm, natomiast wartość modalna wielkości cząstek (tj. wartość o największym prawdopodobieństwie wystąpienia) to 152,57 ± 20,44 nm (Rycina 18). Co ciekawe, na otrzymanym wykresie rozkładu wielkościowego cząstek w analizowanych próbkach, zaobserwowano dwa

główne piki, przy wartościach średnicy czastek 134 nm oraz 251 nm. Świadczy to o heterogenności izolowanej populacji hiPS-EVs, przy czym warto podkreślić, że pik odpowiadający mniejszym obiektom jest pikiem głównym, co może świadczyć o wzbogaceniu preparatów we frakcję egzosomalną (Rycina 18).

A



B

Parametr		Wartość [nm]
Średnica hydrodynamiczna cząstek	Wartość średnia	215,73 ± 7,18
	Wartość modalna	152,57 ± 20,44
D10		127,27 ± 8,47
D50		189,53 ± 5,32
D90		343,13 ± 28,50

Rycina 18. Analiza rozkładu wielkości cząstek w próbkach hiPS-EVs, wykonana za pomocą techniki śledzenia nanocząstek (NTA). **A**: Reprezentatywny histogram średniego rozkładu (czarna linia), uzyskany z trzech pomiarów pojedynczej próbki. Czerwone obszary wyznaczają SD pomiędzy pomiarami. Niebieskie liczby wskazują maksima poszczególnych pików. **B**: Zestawienie danych liczbowych z wartościami średnimi ± SD dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu (N=3). Parametry D10, D50 oraz D90 wskazują, że odpowiednio 10 %, 50 % lub 90 % populacji pęcherzyków ma średnicę mniejszą lub równą od podanej wartości.

Analiza NTA umożliwiła także pomiar stężenia pęcherzyków w próbkach. W badaniach ustalono, że średnie stężenie EVs uzyskane w izolowanych preparatach wynosiło $3{,}0 \pm 1{,}0 \cdot 10^8$ cząstek/ml. Wartość ta odpowiadała stężeniu 2 µg/ml białka w próbkach hiPS-EVs, wyznaczonemu na podstawie pomiaru z zastosowaniem metody

Bradforda. Ponadto, po uwzględnieniu rozcieńczenia zastosowanego podczas analizy NTA, obliczono stężenie cząstek w wyjściowych próbkach hiPS-EVs, otrzymanych bezpośrednio po ultrawirowaniu, wynoszące 2,2 ± 0,4·10^8 cząstek/µl (Tabela 17).

Tabela 17. Analiza stężenia cząstek w badanych próbkach hiPS-EVs, z zastosowaniem techniki NTA. Trzy próbki hiPS-EVs (N=3) uzyskane z niezależnych izolacji z pożywek kondycjonowanych znad komórek hiPS, rozcieńczano do pomiaru w taki sposób, aby końcowe stężenie białka w próbce wynosiło 2 µg/ml. Znając stężenie białka w wyjściowych próbkach obliczano krotność ich rozcieńczenia, a następnie liczbę cząstek w objętości cieczy próbki pomiarowej oraz wyjściowej próbki hiPS-EVs (uzyskanej bezpośrednio po izolacji).

Nr próbki hiPS-EVs	Stężenie białka w wyjściowej próbce hiPS-EVs [µg/µl], uzyskane metodą Bradforda	Stężenie białka w rozcieńczonej próbce hiPS-EVs przygotowanej do pomiaru NTA [µg/ml]	Krotność rozcieńczenia wyjściowej próbki hiPS-EVs do pomiaru NTA	Liczba cząstek w rozcieńczonej próbce hiPS-EVs, uzyskana z pomiaru NTA [·10^8 cząstek/ml]	Liczba cząstek w wyjściowej próbce hiPS-EVs [·10^8 cząstek/µl]
Próbka 1	2,0	2,0	1000	2,5	2,5
Próbka 2	1,0		500	4,2	2,1
Próbka 3	1,5		750	2,4	1,8
Średnia ± SD				**3,0 ± 1,0**	**2,2 ± 0,4**

W następnym etapie, przeprowadzono analizę fenotypu hiPS-EVs z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Zastosowano w tym celu cytometr Apogee A50-Micro, cechujący się wysoką rozdzielczością i niskim progiem detekcji, dedykowany do analizy cząstek o rozmiarach submikronowych. Przed pomiarem, próbki hiPS-EVs barwiono przeciwciałami monoklonalnymi sprzężonymi z fluorochromami, skierowanymi przeciwko wybranym markerom powierzchniowym, charakterystycznym zarówno dla pęcherzyków (416), jak i obecnym na rodzicielskich komórkach hiPS (396). Przygotowano także próbki wyznakowane odpowiednimi przeciwciałami, stanowiącymi kontrole izotypowe, których zastosowanie minimalizuje ryzyko nieprawidłowego bramkowania obiektów, co z doświadczenia własnego wydaje się być krytycznym czynnikiem determinującym jakość przeprowadzonej analizy cytometrycznej próbek EVs.
Dodatkowo, kierując się przesłankami literaturowymi, świadczącymi o tym, że różne typy cząsteczek RNA są jednym z kluczowych składników obecnych w EVs (290, 293), a ultrawirowanie może skutkować ko-izolacją różnego rodzaju zanieczyszczeń (w tym np. agregatów białkowych) (329), dla zwiększenia specyficzności analizy wszystkie

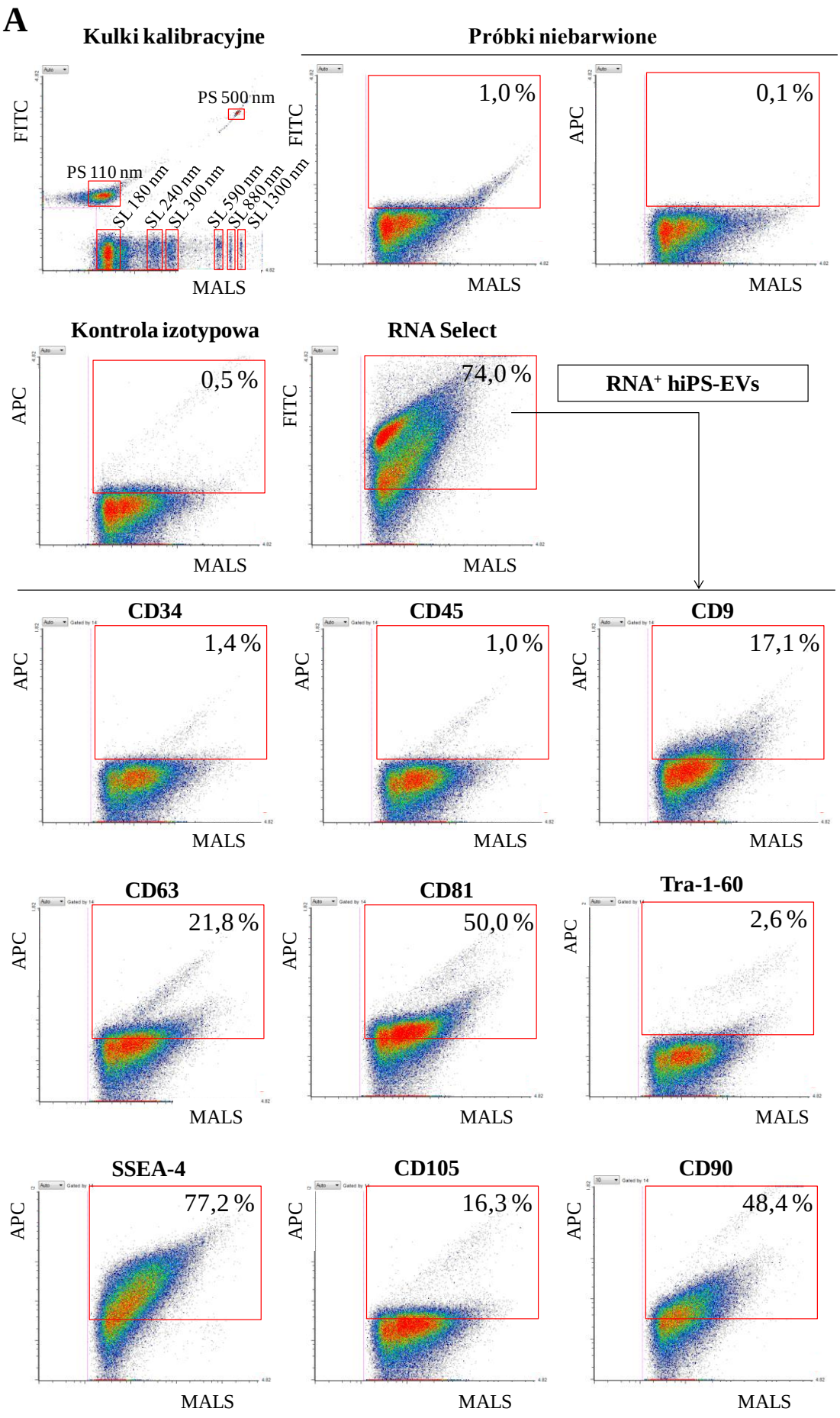
próbki hiPS-EVs barwiono także barwnikiem RNA Select, który po związaniu z RNA obecnym w EVs i wzbudzeniu laserem niebieskim - wykazuje zieloną fluorescencję. Następnie, przeprowadzano analizę cytometryczną tak przygotowanych próbek badanych oraz kontrolnych. W strategii bramkowania analizowano obecność markerów powierzchniowych na obiektach RNA Select^{+}, przyjmując, że stanowią one frakcję nieuszkodzonych, integralnych pęcherzyków zawierających RNA. Założono tym samym, że obiekty RNA Select^{-} będą stanowiły zanieczyszczenie próbek hiPS-EVs w postaci m.in. agregatów białkowych, pozostałości po zdezintegrowanych pęcherzykach oraz innych artefaktów.

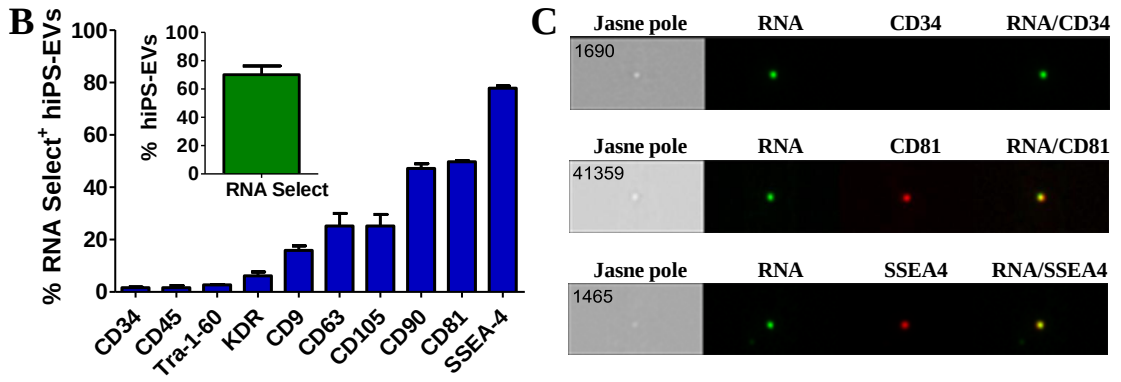
Uzyskane wyniki wskazują, że większość obiektów obecnych w próbkach hiPS-EVs stanowią pęcherzyki pozytywne dla barwnika RNA Select (68,2 ± 7,3 %; Rycina 19A i B). Część z nich posiada jednocześnie typowe dla egzosomów tetraspaniny, w tym CD9 (15,9 ± 1,8 %), CD63 (25,2 ± 4,8 %) oraz CD81 (49,7 ± 0,4 %). Ponadto wykazano, że na większości nanocząstek hiPS-EVs RNA Select^{+} obecny jest także antygen SSEA-4 (77,8 ± 0,9 %) charakterystyczny dla ludzkich komórek pluripotencjalnych, jednak inny marker tych komórek- Tra-1-60 znajduje się jedynie na 2,7 ± 0,1 % badanych obiektów (Rycina 19A i B).

Inne markery, których wysoka ekspresja została przez nasz zespół potwierdzona na komórkach hiPS (396), były również obecne na części pęcherzyków w badanych próbkach hiPS-EVs, w tym: KDR (6,2 ± 1,5 %), CD90 (47,2 ± 1,8 %) oraz CD105 (25,2 ± 4,4 %). Co istotne, analizowane pęcherzyki nie posiadały markerów komórek hematopoetycznych, w tym CD34 oraz CD45, co również potwierdza specyficzność analizy ich fenotypu oraz wyklucza możliwość przenoszenia tych antygenów hematopoetycznych na komórki CD34^{+} z KP (Rycina 19A i B).

Dodatkowo, obecność hiPS-EVs o wskazanym fenotypie antygenowym potwierdzono także analizując wybarwione próbki za pomocą cytometru obrazowego ImageStream X MkII. Poprzedzona procesem optymalizacji modyfikacja standardowego protokołu analizy obiektów komórkowych, w tym użycie obiektywu o powiększeniu 60- krotnym oraz wolnego przepływu odpowiednio rozcieńczonych próbek, umożliwiła uzyskanie obrazów badanych nanocząstek w kanałach fluorescencji oraz w kanale dla jasnego pola (Rycina 19C). Tym samym, ta unikatowa analiza z zastosowaniem cytometrii obrazowej potwierdziła obecność pęcherzyków o submikronowych rozmiarach, zawierających RNA oraz odpowiednie markery powierzchniowe w badanych próbkach EVs. Jednocześnie, możliwość obrazowania pojedynczych obiektów wykluczyła ryzyko analizy artefaktów optycznych oraz obiektów stanowiących ewentualne zanieczyszczenie próbek pomiarowych.

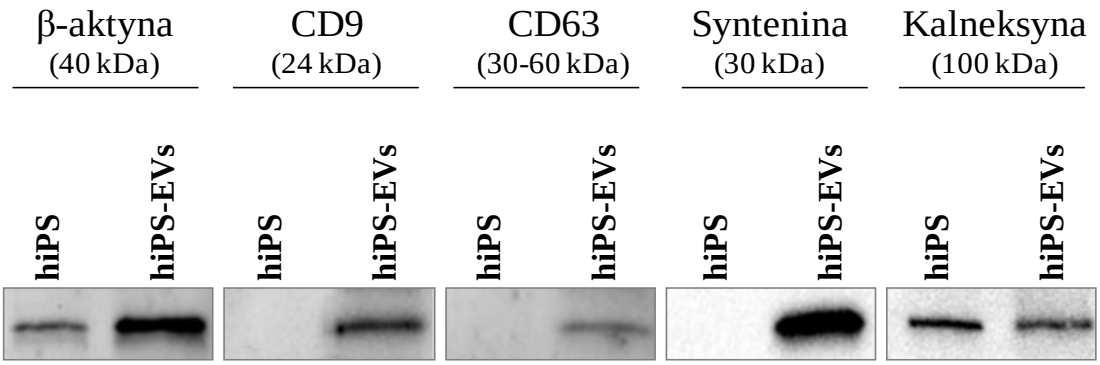
W celu uzupełnienia analizy cytometrycznej oraz potwierdzenia obecności wybranych białek typowych dla pęcherzyków zewnątrzkomórkowych w badanych próbkach hiPS-EVs, przeprowadzono także analizę typu Western Blot. Wykazała ona obecność zarówno wybranych tetraspanin (CD9, CD63), jak i cytoplazmatycznego białka synteniny w próbkach pęcherzyków. Co istotne, otrzymane dane wskazują także (pół-ilościowo), że hiPS-EVs są wzbogacone w te białka w porównaniu do ich komórek rodzicielskich (Rycina 20).


A
Kulki kalibracyjne
Próbki niebarwione
PS 500 nm
PS 110 nm
SL 180 nm
SL 240 nm
SL 300 nm
SL 590 nm
SL 880 nm
SL 1300 nm
FITC
MALS
1,0 %
APC
0,1 %
Kontrola izotypowa
0,5 %
RNA Select
74,0 %
RNA+ hiPS-EVs
CD34
1,4 %
CD45
1,0 %
CD9
17,1 %
CD63
21,8 %
CD81
50,0 %
Tra-1-60
2,6 %
SSEA-4
77,2 %
CD105
16,3 %
CD90
48,4 %



Rycina 19. Analiza obecności markerów powierzchniowych na hiPS-EVs z zastosowaniem wysokorozdzielczej cytometrii przepływowej oraz obrazowej. Próbki hiPS-EVs barwiono immunofluorescencyjnie oraz za pomocą barwnika RNA Select. **A:** Reprezentatywne wykresy kropkowe ekspresji wybranych antygenów, uzyskane za pomocą cytometru przepływowego Apogee A50-Micro oraz dedykowanego oprogramowania Histogram (*Apogee Flow Systems*). W lewym górym rogu zamieszczono przykładowy wykres analizy kulek kalibracyjnych Apogee Calibrating Beads #1493 (*Apogee Flow Systems*), będących mieszaniną kulek o zdefiniowanej wielkości, w tym kulek: polistyrenowych (PS) wykazujących zieloną fluorescencję oraz niefluoryzujących kulek silikonowych (SL). Następnie, przedstawiono wykresy dla próbek kontrolnych oraz badanych, w kanałach detekcji sygnału: zielonej fluorescencji (FITC) dla barwnika RNA Select oraz fluorescencji od barwnika APC (w którym odbywa się też detekcja sygnału od barwnika Alx647), względem parametru rozproszenia światła MALS (z ang. *medium angle light scatter*), proporcjonalnego do względnej wielkości analizowanych cząstek. Podane wartości procentowe odpowiadają odsetkowi obiektów w czerwonych obszarach (bramkach), w porównaniu do wszystkich cząstek obecnych na danym wykresie. Podczas analizy obecności poszczególnych markerów powierzchniowych, w strategii bramkowania uwzględniono tylko obiekty RNA Select$^+$. **B:** Wyniki zbiorcze analizy odsetka cząstek pozytywnych względem barwnika RNA Select oraz posiadających jednocześnie badane antygeny powierzchniowe, przedstawione jako średnia ± SD dla trzech niezależnych powtórzeń eksperymentu (N=3). **C**: Przykładowe obrazy hiPS-EVs w jasnym polu, pojedynczych kanałach fluorescencji oraz jako nałożenie obu kanałów fluorescencji, uzyskane za pomocą cytometru obrazowego ImageStream MkII oraz dedykowanego oprogramowania IDEAS. Przedstawiono wybrane galerie dla próbek wybarwionych barwnikiem RNA Select oraz przeciwciałami przeciwko trzem antygenom: CD34, CD81 oraz SSEA4. Akwizycję obiektów prowadzono z zastosowaniem obiektywu o powiększeniu 60x. Numery na zdjęciach w jasnym polu wskazują numer analizowanego obiektu w galerii obrazów.

Ponadto, stwierdzono również obecność kalneksyny w próbkach hiPS-EVs, jednakże poziom tego białka był niższy w porównaniu z lizatem z komórek hiPS (Rycina 20). Jako białko występujące w retikulum endoplazmatycznym (417), kalneksyna uważana jest obecnie za marker negatywny dla egzosomów (416). Stąd też, otrzymany wynik może wskazywać na obecność nie tylko egzosomów, ale także większych mikropęcherzyków w próbkach hiPS-EVs (416, 418).



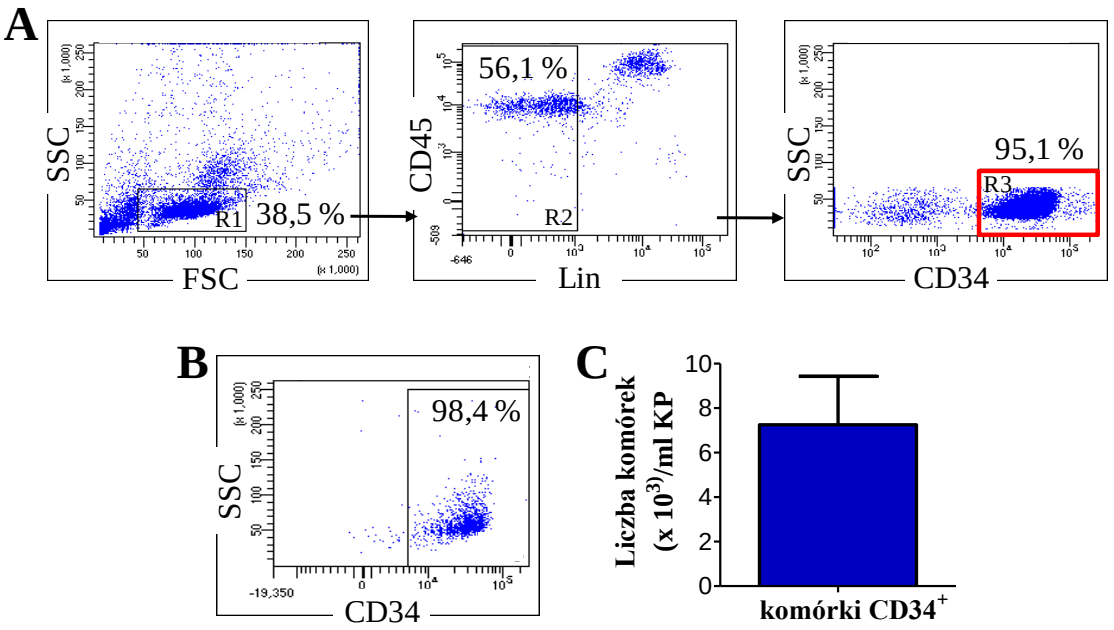
Rycina 20. Analiza Western Blot obecności wybranych białek w próbkach hiPS-EVs oraz ich komórkach rodzicielskich. Reprezentatywne membrany z porównaniem ekspresji tetraspanin (CD9, CD63), cytoplazmatycznego białka synteniny oraz kalneksyny asocjującej z przedziałem retikulum endoplazmatycznego. W analizie badano także obecność β-aktyny jako białka kontrolnego. W przypadku obu typów próbek (hiPS oraz hiPS-EVs) nakładano na żele taką samą ilość białka. W nawiasach podano masy molekularne poszczególnych białek, wyrażone w kilodaltonach (kDA).

Podsumowując, przeprowadzone pomiary wykazały, że próbki hiPS-EVs zawierają heterogenną mieszaninę pęcherzyków komórkowych o submikronowej średnicy hydrodynamicznej. Ponadto, stwierdzono, że cząstki te posiadają zróżnicowaną zawartość biologiczną, w postaci zarówno RNA, jak i markerów powierzchniowych, obecnych na ich komórkach rodzicielskich. Co istotne, wykazano także, że próbki hiPS-EVs wzbogacone są w białka charakterystyczne dla egzosomów oraz ektosomów. Tym samym, analiza próbek hiPS-EVs wykazała, że obecne w nich cząstki spełniają kryteria definicji EVs, opracowane przez ISEV (416).

4.2. Izolacja oraz hodowla frakcji komórek z KP wzbogaconej w HSCs *in vitro*

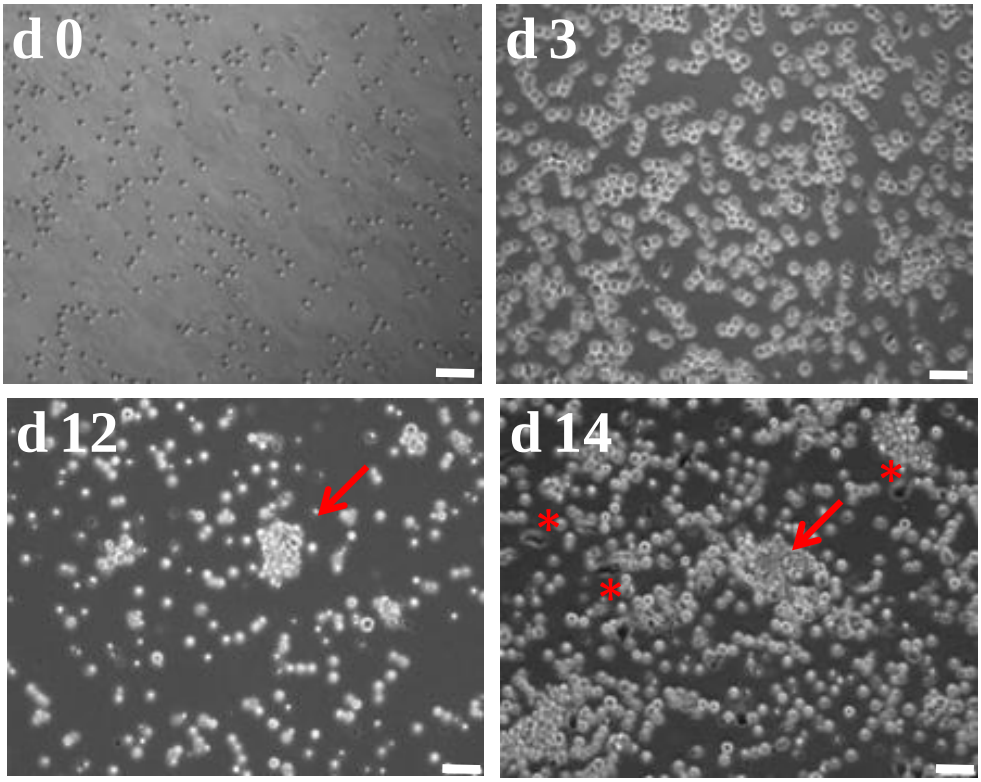
W celu izolacji komórek krwiotwórczych z KP, opracowano trzyetapowy proces ich separacji. W pierwszej kolejności krew lizowano w hipotonicznym buforze, w celu usunięcia erytrocytów. Następnie, pozostałe komórki jądrzaste poddawano wstępnej separacji za pomocą sortera magnetycznego (MACS), uzyskując frakcję wzbogaconą w komórki $CD34^+$. W kolejnym kroku wysokooczyszczoną frakcję komórek $CD34^+$ izolowano z wykorzystaniem metody FACS (Rycina 21A). W ten sposób, każdorazowo czystość otrzymanych frakcji $CD34^+$ wynosiła > 98 % (Rycina 21B), a liczba komórek wyizolowanych z objętości 1 ml KP wynosiła $7{,}1 \pm 2{,}1 \cdot 10^3$ (Rycina 21C), przy czym poszczególne jednostki KP, które zużyto w czasie eksperymentów, miały objętość od 15 ml do 110 ml (N=78).

Następnie, tak wyizolowane komórki $CD34^+$ poddawano ekspansji *ex vivo* w komercyjnie dostępnej pożywce bezsurowiczej z dodatkiem cytokin (FLT3L, trombopoetyny oraz SCF), dedykowanej do hodowli ludzkich krwiotwórczych komórek macierzystych i progenitorowych.



Rycina 21. Izolacja komórek CD34$^+$ z KP za pomocą FACS. Komórki „frakcji pozytywnej" otrzymanej po izolacji za pomocą MACS, wzbogaconej w komórki CD34$^+$, znakowano immunofluorescencyjnie i sortowano z zastosowaniem sortera BD FACSAria III. **A:** Przykładowe wykresy kropkowe strategii sortu komórek CD34$^+$. Najpierw bramkowano małe (FSC^{low}) komórki o niskiej ziarnistości (SSC^{low}) (bramka R1), a następnie spośród nich komórki CD45^{dim} oraz negatywne wobec markerów liniowych (Lin), charakterystycznych dla dojrzałych komórek krwi (bramka R2). W obrębie tej subpopulacji bramkowano komórki z ekspresją antygenu CD34 (bramka R3), które następnie sortowano do probówek z pożywką hodowlaną. **B:** Przykładowy wykres kropkowy czystości frakcji wysortowanych komórek, wskazujący na bardzo wysoką (> 98 %) czystość sortu. Podane wartości procentowe odpowiadają odsetkowi obiektów w bramkach, w porównaniu do wszystkich komórek obecnych na danym wykresie. **C**: Wykres średniej ± SD liczby komórek CD34$^+$ wysortowanych z 1 ml KP (dane dla 8-u reprezentatywnych jednostek KP; N=8). Wartości liczbowe uzyskiwano z informacji podawanych każdorazowo przez oprogramowanie sortera.

Istotnie, w trakcie hodowli komórek CD34$^+$ obserwowano przyrost liczby komórek (szczegółowe dane liczbowe opisano w Podrozdziale 4.4. pt. *Analiza wpływu hiPS-EVs na tempo ekspansji komórek HSCs z KP in vitro*), które morfologicznie cechowały się okrągłym kształtem oraz niskim potencjałem do adhezji do dna naczyń hodowlanych (Rycina 22). Co ciekawe, namnażające się komórki stopniowo zmieniały swoją morfologię w czasie trwania hodowli, zwiększając swoje rozmiary w porównaniu do komórek bezpośrednio po izolacji. Ponadto, począwszy od ok. 8-9 dnia hodowli, część z nich tworzyła grudkowate, pływające kolonie lub agregaty oraz przyjmowała zróżnicowany kształt, wykazując przy tym zwiększoną tendencję do adhezji, co może świadczyć o postępującym spontanicznym różnicowaniu tych komórek, pomimo hodowli w pożywce dedykowanej do ich ekspansji (Rycina 22).



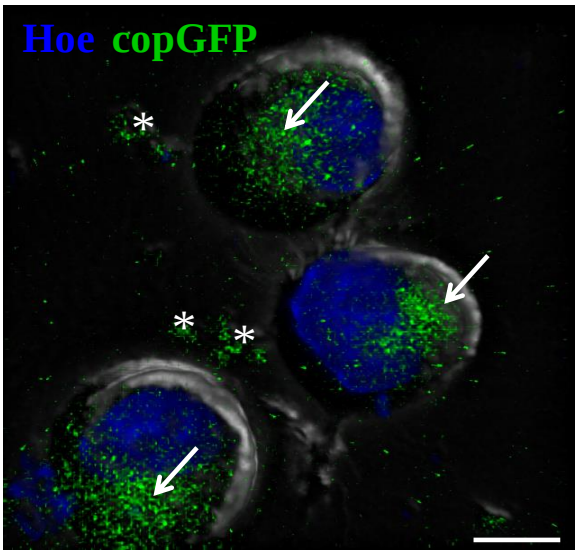
Rycina 22. Morfologia komórek CD34$^+$ z KP, poddanych ekspansji *ex vivo* w dedykowanej, bezsurowiczej pożywce hodowlanej. Przykładowe zdjęcia komórek w kontraście faz, bezpośrednio po izolacji (d 0) oraz w 3, 12 i 14 dniu hodowli w pożywce Stem Span SFEM II wraz z Suplementem CC110 (*Stem Cell Technologies*), wykonane za pomocą mikroskopu Olympus IX81. Paski skali oznaczają 50 µm. Czerwonymi strzałkami zaznaczono pojawiające się agregaty komórek, czerwonymi znakami „*" oznaczono komórki o zmienionej morfologii, która może świadczyć o procesie ich różnicowania.

Podsumowując, zastosowanie dwuetapowej procedury sortowania - obejmującej kroki z zastosowaniem MACS i FACS oraz poprzedzonej lizą erytrocytów, umożliwiło efektywną izolację frakcji komórek CD34$^+$ o bardzo wysokiej czystości. Ponadto, komórki te podejmowały aktywność proliferacyjną w dedykowanej pożywce bezsurowiczej, co umożliwiło ich ekspansję *ex vivo* w ograniczonym czasie.

4.3. Ocena internalizacji hiPS-EVs przez komórki CD34$^+$ *in vitro*

We wcześniejszej pracy naszego zespołu wykazano, że EVs uwalniane przez komórki hiPS są w stanie fuzjować z błoną pierwotnych komórek serca *in vitro*, przenosząc bioaktywną zawartość w postaci mRNA, miRNA i białek (396). Dlatego, w ramach badań objętych niniejszą rozprawą doktorską zbadano czy hiPS-EVs mogą również oddziaływać z komórkami HSCs, wyizolowanymi z KP. Miało to szczególne znaczenie z uwagi na fakt, że komórki te są niewielkich rozmiarów, wykazują wysoki stosunek jądra do cytoplazmy i powierzchni błony, a w czasie krótkiej hodowli *in vitro* wykazują niski stopień adhezji do podłoża. Czynniki te potencjalnie mogłyby utrudniać interakcję tych komórek z EVs.

W tym celu, komórki $CD34^+$ z KP poddawano 2-godz. inkubacji z EVs, wydzielanymi przez komórki hiPS z nadekspresją białka copGFP, wykazującego zieloną fluorescencję (copGFP hiPS-EVs), co ułatwiło późniejszą wizualizację pęcherzyków. Po czasie inkubacji, za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej oceniano czy doszło do kontaktu pęcherzyków z komórkami $CD34^+$, a w konsekwencji do wniknięcia ich zawartości do wnętrza komórek. Istotnie, przeprowadzone obserwacje wskazują na pojawienie się sygnału zielonej fluorescencji w komórkach $CD34^+$, akumulującego się podbłonowo w przedziale cytoplazmatycznym (Rycina 23).



Rycina 23. Wizualizacja internalizacji hiPS-EVs do komórek $CD34^+$ z KP *in vitro*. Komórki wysiewano na szklane dno szalki WillCo pokrytej ludzką fibronektyną, a następnie inkubowano z copGFP hiPS-EVs przez 2 godz. Po usunięciu niezwiązanych pęcherzyków jądra komórkowe wybarwiano przyżyciowo barwnikiem jądrowym Hoechst 33342 (Hoe). Zdjęcia komórek wykonano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Leica DMI6000B, przy zastosowaniu obiektywu immersyjnego o powiększeniu 100x i aperturze 1,47. Przedstawiono reprezentatywny obraz, jako nałożenie zdjęć dla pola widzenia przy zastosowaniu kontrastu interferencyjno-modulacyjnego oraz kanałów fluorescencyjnych dla copGFP (zielony) i Hoe (niebieski). Białe strzałki oznaczają copGFP hiPS-EVs zlokalizowane w cytoplazmie komórek $CD34^+$. Białe gwiazdki wskazują zagregowane copGFP hiPS-EVs obecne na zewnątrz komórek. Pasek skali wskazuje 5 μm.

Co ciekawe, zaobserwowano także sygnał od agregatów pęcherzyków, przyczepionych do błon komórek, które, prawdopodobnie ze względu na zbyt dużą średnicę, nie mogły zostać zinternalizowane.

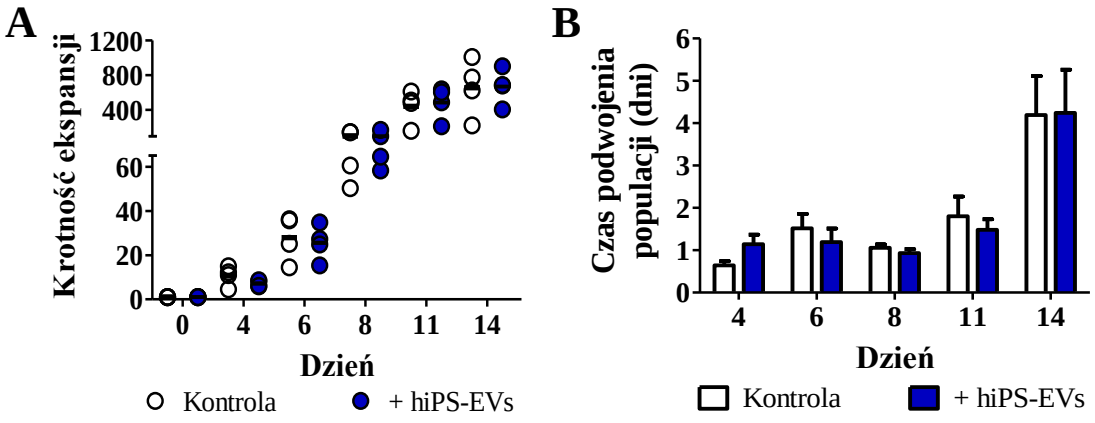
Podsumowując, uzyskane wyniki świadczą o możliwości bezpośredniej interakcji *in vitro* hiPS-EVs z komórkami $CD34^+$ izolowanymi z KP, a tym samym o możliwości przekazania bioaktywnej zawartości tych pęcherzyków do wnętrza komórek krwiotwórczych, co może mieć istotne znaczenie z punktu widzenia regulacji funkcji tych komórek.

4.4. Analiza wpływu hiPS-EVs na tempo ekspansji komórek HSCs z KP *in vitro*

W celu oceny wpływu hiPS-EVs na tempo ekspansji komórek krwiotwórczych izolowanych z KP *in vitro*, komórki $CD34^+$ hodowano przez 14 dni w pożywce zawierającej dodatek hiPS-EVs (2 µg/ml), którą wymieniano co 2 dni. Następnie, w 4, 6, 8, 11 i 14 dniu ekspansji liczono komórki namnażane w obecności hiPS-EVs, w porównaniu do komórek kontrolnych.

Na podstawie przeprowadzonych analiz obliczono, że po 14 dniach hodowli komórki kontrolne zwiększyły swoją liczbę ponad 600-krotnie (656,6 ± 331,4), w porównaniu do liczby wysianej wyjściowo do ekspansji. W przypadku komórek namnażanych w pożywce z dodatkiem hiPS-EVs wartość ta (tj. krotność zwiększenia liczby w porównaniu do wyjściowej liczby komórek umieszczonych w hodowli) była porównywalna i wynosiła 669,2 ± 203,7. Analiza statystyczna wykazała brak istotnych różnic w tempie proliferacji pomiędzy komórkami kontrolnymi, a namnażanymi w obecności hiPS-EVs (Rycina 24A), co świadczy o braku wpływu hiPS-EVs na efektywność ekspansji komórek HSCs.

Warto zauważyć, że z obliczeń czasu podwojenia populacji wynika, że powyżej 11 dnia hodowli tempo ekspansji komórek $CD34^+$, zarówno kontrolnych, jak i hodowanych w pożywce z hiPS-EVs, ulegało znaczącemu obniżeniu (Rycina 24B), co korelowało z mikroskopową obserwacją świadczącą o zwiększeniu się liczby obumierających komórek, cechujących się charakterystycznym, nieregularnym obrazem morfologicznym. Tym samym, ekspansja *ex vivo* komórek $CD34^+$ z KP nie była możliwa przez czas dłuższy niż 14 dni.

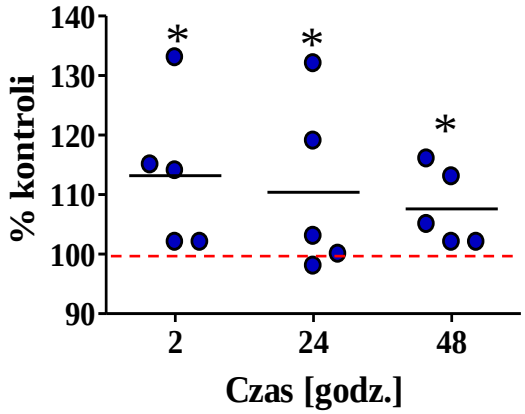


Rycina 24. Analiza tempa ekspansji komórek $CD34^+$ izolowanych z KP *in vitro*. Po izolacji komórki $CD34^+$ hodowano przez 14 dni w dedykowanej pożywce, zawierającej dodatek hiPS-EVs (2 µg/ml). Kontrolę stanowiły komórki hodowane w pożywce bez pęcherzyków. W 4, 6, 8, 11 i 14 dniu ekspansji porównywano liczbę komórek $CD34^+$ namnażanych w obecności hiPS-EVs, w porównaniu do komórek kontrolnych. **A:** Wykres kropkowy przyrostu liczby komórek w porównaniu do liczby komórek wysianych po izolacji, wyrażony jako krotność ekspansji, w poszczególnych dniach hodowli. Każdy z punktów na wykresie odpowiada pomiarowi w obrębie jednego powtórzenia eksperymentu (N=4). Czarna pozioma linia wskazuje wartość średnią. **B:** Wykres średniej ± SD (N=4) czasu podwojenia populacji w poszczególnych dniach hodowli, obrazujący spadek potencjału proliferacyjnego komórek.

Podsumowując, wykazano, że efektywna ekspansja *ex vivo* frakcji wzbogaconych w HSCs izolowanych z KP jest możliwa jedynie przez ograniczony czas (do 14 dni). Jednocześnie, dodatek hiPS-EVs do pożywki hodowlanej nie zwiększa w istotny sposób aktywności proliferacyjnej tych komórek.

4.5. Ocena wpływu hiPS-EVs na aktywność metaboliczną komórek HSCs z KP *in vitro*

Pomimo braku wyraźnego wpływu hiPS-EVs na tempo ekspansji oczyszczonej frakcji komórek krwiotwórczych z KP *ex vivo*, dalsza analiza wykazała, że inkubacja komórek $CD34^+$ z hiPS-EVs zwiększa ich aktywność metaboliczną. Świadczą o tym wyniki uzyskane z pomiarów stężenia komórkowego ATP - wskazujące, że komórki $CD34^+$ poddane inkubacji z hiPS-EVs produkowały więcej ATP w porównaniu do komórek kontrolnych (Rycina 25). Co ciekawe, zwiększenie aktywności metabolicznej było najwyższe dla komórek inkubowanych w pożywce z hiPS-EVs krótkotrwale - tj. przez 2 godz. (113,2 ± 12,7 % kontroli), a efekt ten stopniowo zmniejszał się, gdy komórki były stymulowane pęcherzykami przez 24 godz. (110,4 ± 14,6 % kontroli) lub 48 godz. (107,6 ± 6,5 % kontroli).



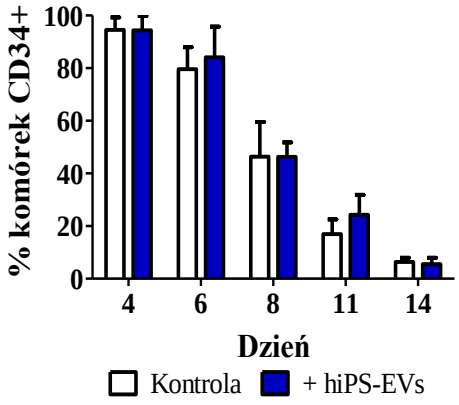
Rycina 25. Analiza ilościowa wpływu hiPS-EVs na aktywność metaboliczną komórek $CD34^+$ z KP. Komórki po 7-dniowej ekspasji *ex vivo* inkubowano w pożywce zawierającej hiPS-EVs (2 µg/ml) przez 2, 24 lub 48 godz. Po tym czasie mierzono stężenie ATP zawartego w komórkach za pomocą zestawu ATPLite Lumiescence Assay System. Na wykresie przedstawiono dane dla komórek inkubowanych z hiPS-EVs, wyrażając je jako % wartości uzyskanej dla komórek kontrolnych. Każdy z punktów na wykresie odpowiada pomiarowi w obrębie jednego powtórzenia eksperymentu (N=5). Czarna pozioma linia wskazuje wartość średnią. Przerywaną linią czerwoną oznaczono poziom dla komórek kontrolnych (100%). *$p<0,05$ względem kontrolnych komórek $CD34^+$.

Zatem, uzyskane wyniki wskazują, że hiPS-EVs mogą przejściowo zwiększać aktywność metaboliczną namnażanych komórek $CD34^+$ izolowanych z KP, o czym świadczy zwiększona synteza ATP, a siła tego efektu zależy od czasu stymulacji komórek z pęcherzykami. Wzrost efektywności metabolicznej może świadczyć o aktywacji innych procesów w tych komórkach, istotnych dla ich funkcji biologicznych.

4.6. Ocena wpływu ekspansji komórek krwiotwórczych z KP z hiPS-EVs na ich różnicowanie w kierunku linii hematopoetycznych *in vitro*

W trakcie 14-dniowej hodowli komórek $CD34^+$ wyizolowanych z KP *in vitro* obserwowano stopniową zmianę ich morfologii, która mogła wskazywać na spontaniczne różnicowanie w kierunku bardziej dojrzałych komórek linii hematopoetycznych. Dlatego, równolegle z analizą tempa proliferacji tych komórek, badano także kinetykę zmian ich fenotypu antygenowego w poszczególnych dniach ekspansji. Ponadto, analizowano także wpływ hiPS-EVs na zmiany fenotypowe, świadczące o różnicowaniu się tych komórek. W tym celu, w poszczególnych dniach hodowli przeprowadzano analizę cytometryczną komórek uprzednio wyznakowanych przeciwciałami skierowanymi przeciwko wybranym antygenom powierzchniowym, charakterystycznym dla poszczególnych linii hematopoetycznych (tzw. markerom liniowym).

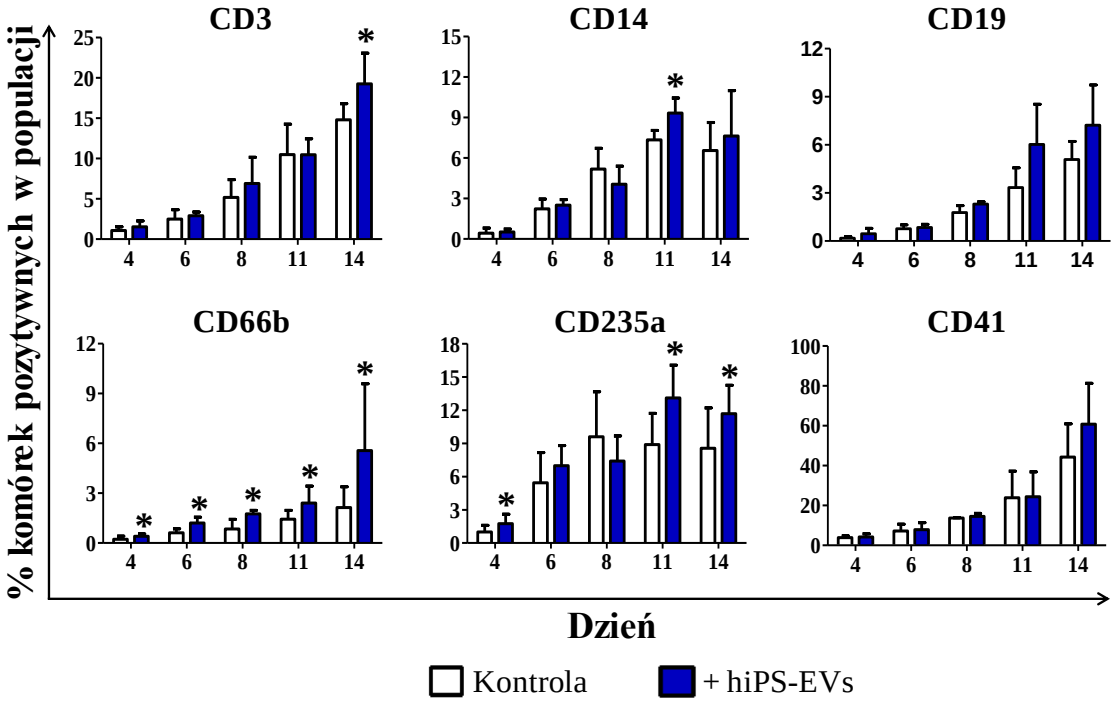
Istotnie, zaobserwowano, że stopniowy spadek potencjału proliferacyjnego komórek w trakcie ich ekspansji korelował ze zmniejszeniem się ekspresji antygenu CD34 na tych komórkach z ok. 95 % w dniu 4 do ok. 5 % w dniu 14, przy czym efekt ten występował zarówno w przypadku komórek hodowanych w pożywce z hiPS-EVs, jak i kontrolnych (Rycina 26, Tabela 17). Ponadto, nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w odsetku komórek pozytywnych dla antygenu CD34 pomiędzy komórkami kontrolnymi a namnażanymi w obecności hiPS-EVs.



Rycina 26. Analiza ilościowa wpływu hiPS-EVs na ekspresję antygenu CD34 na komórkach z KP w trakcie ich ekspansji *ex vivo*. Po izolacji komórki hodowano przez 14 dni w pożywce zawierającej dodatek hiPS-EVs (2 µg/ml). Kontrolę stanowiły komórki hodowane w pożywce bez pęcherzyków. W 4, 6, 8, 11 i 14 dniu ekspansji komórki barwiono immuno-fluorescencyjnie za pomocą przeciwciał anty-CD34. Wybarwione komórki analizowano następnie za pomocą cytometru przepływowego BD LSRFortessa. Wykresy przedstawiono jako % komórek wykazujących ekspresję danego antygenu, w postaci średniej ± SD dla czterech (N=4) powtórzeń eksperymentu.

Spadek ekspresji antygenu CD34 sugerował jednocześnie, że dochodzi do różnicowania komórek w trakcie ich hodowli *in vitro*. Dlatego, w następnym etapie zbadano kinetykę zmian ekspresji wybranych markerów charakterystycznych dla poszczególnych linii hematopoetycznych. Otrzymane wyniki wskazują, że ekspansja

komórek krwiotwórczych *in vitro* powoduje, że część z nich spontanicznie różnicuje w kierunku progenitorów i dojrzałych komórek krwi. Świadczy o tym wzrost odsetka komórek wykazujących ekspresję poszczególnych markerów liniowych z ok. 1-2 % w dniu 4, do kilku, a nawet kilkudziesięciu procent w dniu 14 (Rycina 27, Tabela 18). W szczególności, w przypadku antygenu CD3, charakterystycznego dla limfocytów T, zaobserwowano wzrost ekspresji do 14,8 ± 2,0 % całkowitej liczby komórek w 14 dniu hodowli. Podobnie, procent komórek wykazujących ekspresję CD14 oraz CD19 w 14 dniu ekspansji wynosił odpowiednio 6,6 ± 2,1 % oraz 5,1 ± 1,1 %, co wskazuje na pojawianie się odpowiednio linii limfocytów B i linii monocytarno-makrofagowej w hodowli. Z kolei odesetek komórek linii granulocytarnej ($CD66b^+$) w 14 dniu wynosił 2,1 ± 1,3 %, a linii erytroidalnej ($CD235a^+$) 8,6 ± 3,7 %. Co ciekawe, odsetek komórek wykazujących ekspresję markera megakariocytowego CD41, wynosił aż 43,3 ± 16,7 %. Szczegółowe dane liczbowe dla poszczególnych dni hodowli komórek zestawiono w Tabeli 18.



Rycina 27. Analiza ilościowa wpływu hiPS-EVs na fenotyp komórek $CD34^+$ z KP w trakcie ich ekspansji *ex vivo*. Po izolacji komórki hodowano przez 14 dni w pożywce zawierającej dodatek hiPS-EVs (2 µg/ml). Kontrolę stanowiły komórki hodowane w pożywce bez pęcherzyków. W 4, 6, 8, 11 i 14 dniu ekspansji komórki barwiono immunofluorescencyjnie za pomocą przeciwciał skierowanych przeciwko markerom charakterystycznych dla poszczególnych linii hematopoetycznych: CD3- limfocyty T, CD14- monocyty/makrofagi, CD19- limfocyty B, CD66b- granulocyty, CD235a- erytrocyty, CD41- megakariocyty. Wybarwione komórki analizowano następnie za pomocą cytometru przepływowego BD LSRFortessa. Na wykresach przedstawiono % komórek wykazujących ekspresję danego antygenu, w postaci średniej ± SD dla czterech (N=4) powtórzeń eksperymentu.*$p<0,05$ względem komórek kontrolnych.

Co istotne, zbadano również, czy dodatek hiPS-EVs do pożywki hodowlanej w trakcie ekspansji komórek krwiotwórczych z KP może wpływać na ich potencjał do różnicowania. Rzeczywiście, otrzymane wyniki wskazują, że w obecności hiPS-EVs spontaniczne różnicowanie (tj. różnicowanie w pożywce bez cytokin ukierunkowujących do danej linii hematopoetycznej) komórek HSCs do poszczególnych linii hematopoetycznych było bardziej efektywne (Rycina 27, Tabela 18). W szczególności, procent komórek $CD66b^+$ i $CD235a^+$ był statystycznie wyższy w większości analizowanych punktów czasowych, dla komórek poddanych działaniu hiPS-EVs. Istotność statystyczną odnotowano także w przypadku dnia 14 dla komórek $CD3^+$ oraz w dniu 11 dla analizy ekspresji antygenu CD14 (Rycina 27, Tabela 18).

Tabela 18. Zbiorcze zestawienie wyników analizy wpływu hiPS-EVs na fenotyp komórek $CD34^+$ z KP w trakcie ich ekspansji *ex vivo*. Po izolacji komórki hodowano przez 14 dni w pożywce zawierającej dodatek hiPS-EVs. Kontrolę stanowiły komórki hodowane w pożywce bez pęcherzyków. W 4, 6, 8, 11 i 14 dniu ekspansji analizowano ekspresję antygenu CD34 oraz wybranych markerów liniowych. Dane przedstawiono jako średnią ± SD dla czterech (N=4) powtórzeń eksperymentu.

Antygen	Dodatek hiPS-EVs	Dzień ekspansji				
		4	6	8	11	14
CD34	-	94,5 ± 4,7	79,6 ± 8,4	46,3 ± 13,2	17,0 ± 5,6	6,4 ± 1,6
	+	94,4 ± 5,5	84,1 ± 11,7	46,3 ± 5,5	24,3 ± 7,6	5,5 ± 2,5
CD3	-	1,1 ± 0,5	2,5 ± 1,2	5,2 ± 2,2	10,5 ± 3,8	14,8 ± 2,0
	+	1,5 ± 0,7	2,9 ± 0,5	6,9 ± 3,3	10,5 ± 2,0	19,3 ± 3,8
CD14	-	0,4 ± 0,4	2,2 ± 0,7	5,2 ± 1,5	7,3 ± 0,7	6,6 ± 2,1
	+	0,5 ± 0,2	2,5 ± 0,4	4,1 ± 1,3	9,3 ± 1,1	7,6 ± 3,4
CD19	-	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,2	1,8 ± 0,4	3,3 ± 1,2	5,1 ± 1,1
	+	0,5 ± 0,3	0,9 ± 0,2	2,3 ± 0,1	6,0 ± 2,5	7,2 ± 2,5
CD66b	-	0,2 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,9 ± 0,6	1,4 ± 0,5	2,1 ± 1,3
	+	0,4 ± 0,1	1,2 ± 0,4	1,8 ± 0,2	2,4 ± 1,0	5,6 ± 4,0
CD235a	-	1,0 ± 0,6	5,4 ± 2,7	9,6 ± 4,1	8,9 ± 2,8	8,6 ± 3,7
	+	1,8 ± 0,9	7,0 ± 1,8	7,4 ± 2,3	13,1 ± 3,0	11,7 ± 2,6
CD41	-	3,9 ± 0,8	7,2 ± 3,4	13,7 ± 0,1	23,9 ± 13,3	44,3 ± 16,7
	+	4,2 ± 1,6	7,8 ± 3,5	14,6 ± 1,5	24,4 ± 12,5	60,8 ± 20,5

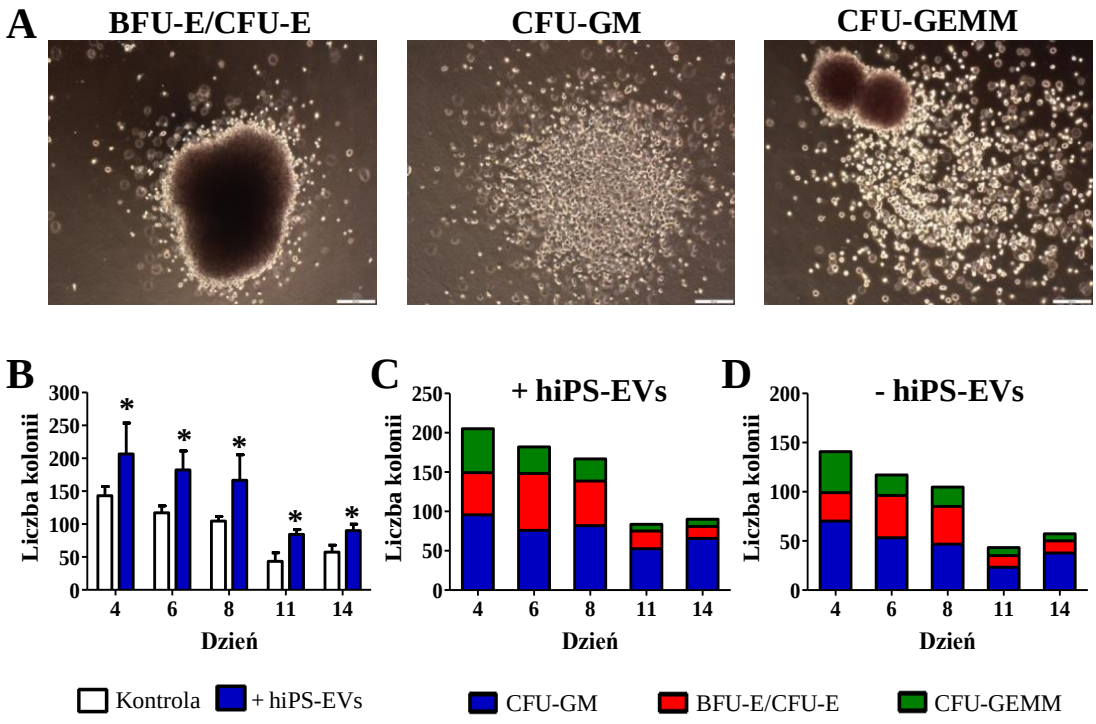
Podsumowując, wykazano, że w trakcie ekspansji *ex vivo* frakcja komórek z KP wzbogaconych w HSCs różnicuje spontanicznie w kierunku poszczególnych linii komórek krwi, pomimo braku w pożywce namnażającej cytokin stymulujących ukierunkowane różnicowanie. Ponadto, obecność hiPS-EVs zwiększa ten potencjał, co może świadczyć o tym, że pęcherzyki te przenoszą cząsteczki sygnałowe stymulujące różnicowanie HSCs.

4.7. Ocena wpływu hiPS-EVs na ukierunkowany potencjał klonogenny komórek HSCs z KP *in vitro*

Potencjał klonogenny HSCs jest istotnym czynnikiem wpływającym na skuteczność rekonstytucji układu krwiotwórczego po ich przeszczepie *in vivo* (419). Z kolei wyniki przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy eksperymentów świadczą o zróżnicowanym wpływie hiPS-EVs na proliferację i spontaniczne różnicowanie komórek krwiotwórczych z KP, będących procesami powiązanymi z ich potencjałem klonogennym (139). Jak opisano wyżej, wykazano bowiem, że hiPS-EVs nie wpływają na proliferację, ale zwiększają różnicowanie się HSCs. Dlatego, w kolejnym etapie badań testowano wpływ hiPS-EVs na zdolność komórek $CD34^+$ do tworzenia różnych typów kolonii hematopoetycznych w półpłynnej metylocelulozie. Zawierała ona czynniki wzrostowe i cytokiny (w tym SCF, GM-CSF, G-CSF, IL-3, IL-6 oraz erytropoetynę), stymulujące HSCs do tworzenia różnych typów kolonii, w zależności od ich stopnia ukierunkowania rozwojowego.

W pierwszej kolejności badano jak zmienia się klonogenność komórek w trakcie ich ekspansji *ex vivo* w pożywce zawierającej hiPS-EVs. W tym celu, komórki w 4, 6, 8, 11 lub 14 dniu ich ekspansji pobierano z hodowli namnażającej i wysiewano w dedykowanej dla testu CFC półpłynnej pożywce (metylocelulozie zawierającej wymienione czynniki wzrostowe). Następnie, po 14 dniach hodowli liczono otrzymane kolonie, z uwzględnieniem ich typu identyfikowanego na podstawie oceny morfologicznej, zgodnie z przyjętymi w hematologii standardami (Rycina 28A). Rozróżniano m.in. kolonie typu BFU-E/CFU-E, CFU-GM oraz CFU-GEMM, co świadczyłoby, że w wyjściowej puli znajdują się m.in. komórki progenitorowe różnicujące odpowiednio w linię erytroidalną oraz granulocytano-makrofagową, a także komórki o właściwościach progenitorów mieloidalnych (z ang. tzw. *common myeloid progenitors*), zdolne do różnicowania w różne linie mieloidalne, co przejawia się heterogennością komórkową wewnątrz jednej kolonii uzyskanej *in vitro* (139, 140).

Otrzymane wyniki wskazują, że podczas ekspansji *ex vivo* potencjał klonogenny komórek krwiotwórczych z KP ulega stopniowemu obniżeniu, o czym świadczy spadek całkowitej liczby kolonii uzyskanych z tej samej liczby komórek wysianych w 4 i 14 dniu ekspansji. W przypadku komórek hodowanych w pożywce bez hiPS-EVs zaobserwowano spadek liczby kolonii otrzymanych po wysianiu 500 komórek $CD34^+$ w dniu 4 oraz 14 ich ekspansji, odpowiednio z 143,0 ± 14,1 do 57,3 ± 10,5 (Rycina 28B). Jednocześnie wykazano, że komórki namnażane w obecności hiPS-EVs tworzyły istotnie statystycznie więcej kolonii w porównaniu do komórek kontrolnych - we wszystkich punktach czasowych trwania ich ekspansji *ex vivo* (Rycina 28B). Najniższy wzrost liczby kolonii - liczony, jako procent wartości uzyskanej dla komórek kontrolnych w danym punkcie czasowym - odnotowano dla komórek po 4 dniach ekspansji (144,1 ± 25,6 % kontroli), a najwyższy dla komórek wysianych po 11 dniach ekspansji (203,7 ± 46,5 % kontroli) (Rycina 28E).



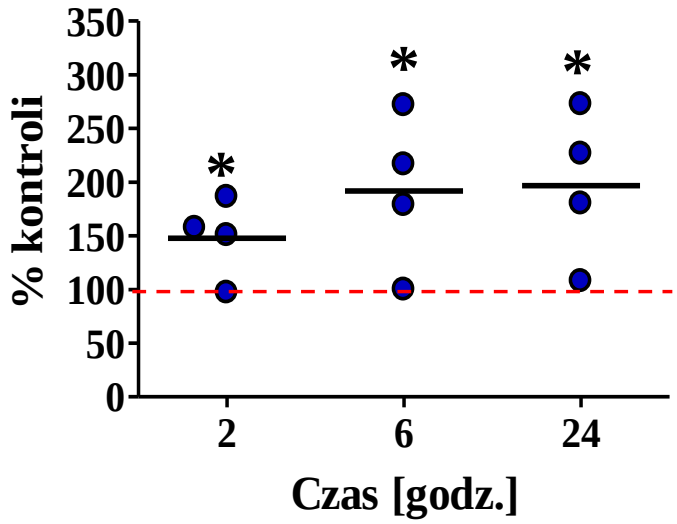
E

Klonogenność komórek namnażanych w pożywce z hiPS-EVs (% kontroli)	Dzień ekspansji				
	4	6	8	11	14
	144,1 ± 25,6	157,6 ± 33,8	158,2 ± 26,2	203,7 ± 46,5	158,5 ± 12,7

Rycina 28. Analiza potencjału klonogennego komórek CD34$^+$ z KP poddawanych ekspansji *ex vivo* w pożywce zawierającej hiPS-EVs. Po izolacji komórki hodowano przez 14 dni w pożywce zawierającej hiPS-EVs (2 µg/ml). Kontrolę stanowiły komórki hodowane w pożywce bez pęcherzyków. W 4, 6, 8, 11 i 14 dniu ekspansji 500 komórek wysiewano w pożywce Human Methylcellulose Enriched Media. Po 14 dniach hodowli liczono poszczególne typy kolonii hematopoetycznych: erytroidalne (ang. *burst forming unit-erythroid*; BFU-E) lub CFU-E (ang. *colony forming unit-erythroid)*, mieszane (ang. *colony forming unit-granulocyte, erythrocyte, macrophage, megakaryocyte*; CFU-GEMM) oraz granulocytarno-makrofagowe (ang. *colony forming unit-granulocyte- macrophage*; CFU-GM). **A**: Reprezentatywne zdjęcia poszczególnych typów kolonii, wykonane za pomocą mikroskopu Olympus IX81. Paski skali wskazują 200 µm. **B**: Suma kolonii otrzymanych z komórek wysianych na test CFC w poszczególnych dniach ich ekspansji. Dane przedstawiono jako średnią ± SD dla trzech (N=3) powtórzeń eksperymentu.*p<0,05 względem komórek kontrolnych. Dane liczbowe przedstawiono także jako średnią liczbę kolonii (N=3) z uwzględnieniem ich typu, dla komórek hodowanych w pożywce z hiPS-EVs (**C**) oraz komórek kontrolnych (**D**). **E**: Klonogenność komórek wyrażona jako % w porównaniu do kontroli (tj. komórek namnażanych w pożywce bez hiPS-EVs), w poszczególnych dniach ekspansji. Dane przedstawiono jako średnią ± SD dla trzech (N=3) powtórzeń eksperymentu.

Świadczy to o pozytywnym wpływie hiPS-EVs na potencjał klonogenny komórek $CD34^+$ z KP, które jednocześnie zachowują zdolność do tworzenia zróżnicowanych typów kolonii. W szczególności, zarówno komórki poddane działaniu pęcherzyków, jak i komórki kontrolne, tworzyły najwięcej kolonii granulocytarno-makrofagowych, a najmniej kolonii mieszanych (Rycina 28C-D).

Ponadto, zbadano także czy krótkoterminowa inkubacja z hiPS-EVs będzie również wpływać na klonogenność tych komórek. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że istotnie statystycznie więcej kolonii uzyskiwano z komórek $CD34^+$ (namnażanych uprzednio *in vitro* przez 7 dni) poddanych działaniu hiPS-EVs przez 2 godz. (147,8 ± 37,2 % kontroli), 6 godz. (191,7 ± 72,0 % kontroli) oraz 24 godz. (196,7 ± 70,3 % kontroli), a następnie wysianych do metylocelulozy celem oceny potencjału klonogennego (Rycina 29).



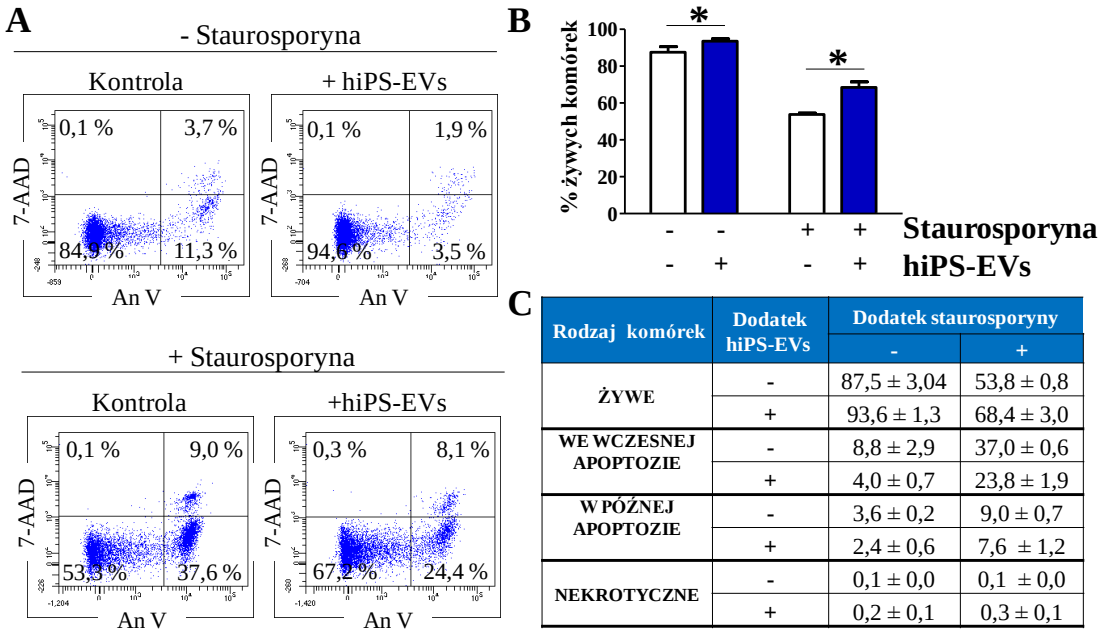
Rycina 29. Analiza potencjału klonogennego komórek $CD34^+$ z KP poddawanych krótkiej inkubacji w pożywce zawierającej hiPS-EVs. Po izolacji komórki namnażano przez 7 dni, a następnie poddawano inkubacji z hiPS-EVs przez 2, 6 lub 24 godz. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane w pożywce bez hiPS-EVs. Następnie, 500 komórek z każdego warunku wysiewano w pożywce Human Methylcellulose Enriched Media. Po 14 dniach hodowli liczono kolonie hematopoetyczne. Wykres przedstawia klonogenność komórek wyrażoną jako % w porównaniu do kontroli, w poszczególnych dniach ekspansji. Każdy z punktów na wykresie odpowiada pomiarowi w obrębie jednego powtórzenia eksperymentu (N=4). Czarna pozioma linia wskazuje wartość średnią. Przerywaną linią czerwoną oznaczono poziom dla komórek kontrolnych (100%). *$p<0,05$ względem kontrolnych komórek $CD34^+$.

Podsumowując, otrzymane dane sugerują, że hiPS-EVs zwiększają potencjał klonogenny komórek krwiotwórczych z KP oceniany *in vitro*, przy czym efekt ten zależy od czasu inkubacji komórek z pęcherzykami, sugerując aktywację szlaków związanych z hematopoezą, co uwidacznia się w późniejszej odpowiedzi komórek.

4.8. Analiza aktywności cytoprotekcyjnej hiPS-EVs wobec komórek CD34$^+$ poddanych działaniu czynnika toksycznego *in vitro*

Poprzednie badania prowadzone w naszym zespole wykazały, że EVs wydzielane przez ludzkie oraz mysie komórki iPS mogą wykazywać działanie cytoprotekcyjne wobec komórek serca oraz śródbłonka *in vitro* (395, 396). Dlatego, w niniejszej pracy zbadano czy hiPS-EVs będą miały podobny wpływ na komórki CD34$^+$ z KP, chroniąc je przed apoptozą wywołaną czynnikami cytotoksycznymi, potencjalnie obecnymi w uszkodzonej niszy szpikowej. W prowadzonych badaniach zastosowano model indukcji procesów apoptozy poprzez dodatek staurosporyny do pożywki hodowlanej. Związek ten hamuje wiązanie cząsteczek ATP do kinazy białkowej C, co skutkuje śmiercią komórki (420, 421).

W celu analizy wpływu hiPS-EVs na zachowanie komórek CD34$^+$ po dodaniu wspomnianego czynnika cytotoksycznego, namnożone w ciągu 7 dni komórki najpierw inkubowano z hiPS-EVs przez 2 godz., a następnie poddawano działaniu staurosporyny, dodając ją do pożywki na 24 godz. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane w pożywce bez dodatku hiPS-EVs. Dodatkowo, aby ocenić efekt samego dodatku pęcherzyków na żywotność komórek, zastosowano również warunek kontrolny, czyli komórki nietraktowane staurosporyną.



C

Rodzaj komórek	Dodatek hiPS-EVs	Dodatek staurosporyny	
		-	+
ŻYWE	-	87,5 ± 3,04	53,8 ± 0,8
	+	93,6 ± 1,3	68,4 ± 3,0
WE WCZESNEJ APOPTOZIE	-	8,8 ± 2,9	37,0 ± 0,6
	+	4,0 ± 0,7	23,8 ± 1,9
W PÓŹNEJ APOPTOZIE	-	3,6 ± 0,2	9,0 ± 0,7
	+	2,4 ± 0,6	7,6 ± 1,2
NEKROTYCZNE	-	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0
	+	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1

Rycina 30. Analiza wpływu hiPS-EVs na żywotność komórek CD34$^+$ poddanych działaniu czynnika cytotoksycznego *in vitro*. Komórki CD34$^+$ po 7 dniach ekspansji *ex vivo* poddawano inkubacji z hiPS-EVs przez 2 godz., dodając następnie do pożywki staurosporynę (100 nM) na 24 godz. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane w pożywce bez pęcherzyków. Dodatkowo, wysiewano również komórki CD34$^+$ w pożywce niezawierającej staurosporyny (kontrola testu). Po inkubacji z w/w czynnikami i ich odpłukaniu, komórki barwiono za pomocą zestawu Annexin V Apoptosis Detection Kit i analizowano z zastosowaniem cytometru przepływowego BD LSRFortessa. **A**: Reprezentatywne wykresy kropkowe uzyskane dla

komórek inkubowanych z hiPS-EVs oraz kontrolnych, w pożywce bez lub z dodatkiem staurosporyny. Podczas analizy bramkowano obiekty: żywe- jako negatywne dla aneksyny V (An V) oraz 7-AAD, we wczesnej (AnV^+ $7\text{-}AAD^-$) oraz późnej apoptozie (AnV^+ $7\text{-}AAD^+$), a także komórki nekrotyczne (AnV^- $7\text{-}AAD^+$). Podane wartości procentowe odpowiadają odsetkowi obiektów w bramkach, w porównaniu do wszystkich komórek obecnych na danym wykresie. **B**: Wykres średniej ± SD procentu żywych (AnV^- $7\text{-}AAD^-$) komórek $CD34^+$, uzyskanej z czterech (N=4) powtórzeń eksperymentu. *p<0,05 względem komórek kontrolnych. **C**: Tabela zbiorcza procentu komórek żywych oraz obecnych w poszczególnych fazach śmierci komórkowej. Dane przedstawiono jako średnią ± SD z czterech (N=4) powtórzeń eksperymentu.

Analiza cytometryczna próbek wybarwionych aneksyną V oraz barwnikiem jądrowym 7-aminoaktynomycyną D (7-AAD) wykazała, że staurosporyna wywołuje śmierć komórek $CD34^+$ na drodze apoptozy, obniżając ich żywotność z wyjściowego poziomu wynoszącego 87,5 ± 3,0 % do 53,8 ± 0,8 % po 24 godz. od dodania wspomnianego czynnika toksycznego (Rycina 30). Jednocześnie, otrzymane wyniki świadczą, że hiPS-EVs częściowo hamują śmierć komórek $CD34^+$, wywołaną dodatkiem staurosporyny (Rycina 30A), co świadczy o ich aktywności cytoprotekcyjnej. W szczególności, w przypadku komórek inkubowanych uprzednio z hiPS-EVs, a następnie poddanych działaniu staurosporyny, procent żywych komórek wynosił 68,4 ± 3,0 %, zatem wzrósł o ok. 15 % w porównaniu do komórek kontrolnych, a różnica ta była istotna statystycznie (Rycina 30B-C). Ponadto, zaobserwowano również pozytywny efekt hiPS-EVs na komórki inkubowane w pożywce bez czynnika cytotoksycznego, przejawiający się zwiększeniem odsetka żywych komórek w hodowli *in vitro* (87,5 ± 3,0 % vs. 93,6 ± 1,3 % dla komórek kontrolnych vs. komórki inkubowane z hiPS-EVs) (Rycina 30).

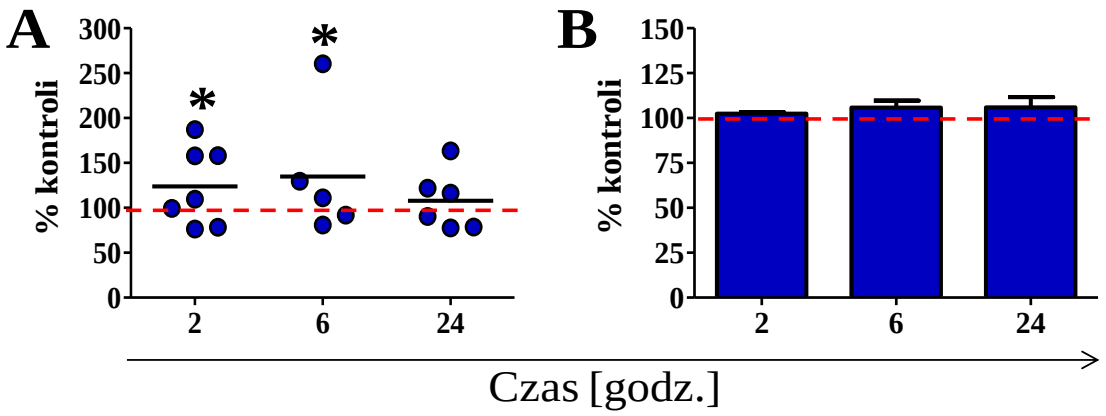
Podsumowując, uzyskane dane wskazują, że hiPS-EVs wykazują aktywność protekcyjną wobec komórek $CD34^+$ z KP w warunkach działania czynnika cytotoksycznego *in vitro*, zwiększając jednocześnie odsetek żywych komórek w hodowli *ex vivo*.

4.9. Ocena aktywności chemotaktycznej *in vitro* komórek krwiotwórczych z KP po kontakcie z hiPS-EVs

Kolejnym etapem badań była ocena wpływu hiPS-EVs na aktywność chemotaktyczną komórek $CD34^+$ z KP. Zasadność tych badań wynikała z faktu, iż podane dożylnie komórki krwiotwórcze aktywnie migrują w kierunku niszy szpikowej, zgodnie z gradientem kluczowego dla nich chemoatraktanta- SDF-1, co jest jednym z istotnych czynników warunkujących efektywne zasiedlanie niszy przez te komórki, a tym samym powodzenie przeszczepu i rekonstytucji SzK (66, 422).

W związku z powyższym, w kolejnym etapie badań przeprowadzono test oceny chemotaksji badanych komórek $CD34^+$ (kontrolnych oraz inkubowanych z hiPS-EVs

przez 2, 6 lub 24 godz.) do SDF-1 w warunkach *in vitro*. W tym celu komórki wysiewano na zmodyfikowaną komorę Boydena, stanowiącą inserty z porami o średnicy 5 µm, zanurzone w dołkach z pożywką zawierającą SDF-1 w stężeniu 100 ng/ml. Następnie, po 3 godz. zliczano liczbę komórek, które aktywnie przemigrowały przez pory do dolnej części komory. Uzyskane wyniki wskazują, że kontakt komórek $CD34^+$ z hiPS-EVs zwiększa ich odpowiedź na bodziec chemotaktyczny, przy czym poziom tej zmiany zależy od czasu inkubacji komórek z pęcherzykami (Rycina 31A). W szczególności, zaobserwowano wzrost odsetka aktywnie migrujących komórek $CD34^+$ po 2 godz. (131,4 ± 42,6 % wartości dla kontroli) i 6 godz. (145,5 ± 79,2 % wartości dla kontroli) inkubacji z hiPS-EVs, w porównaniu z kontrolą. Jednakże, po 24 godz. efekt ten uległ obniżeniu, a chemotaksja komórek powróciła do poziomu dla komórek nietraktowanych pęcherzykami (111,5 ± 35,6 % wartości dla kontroli) (Rycina 31A).

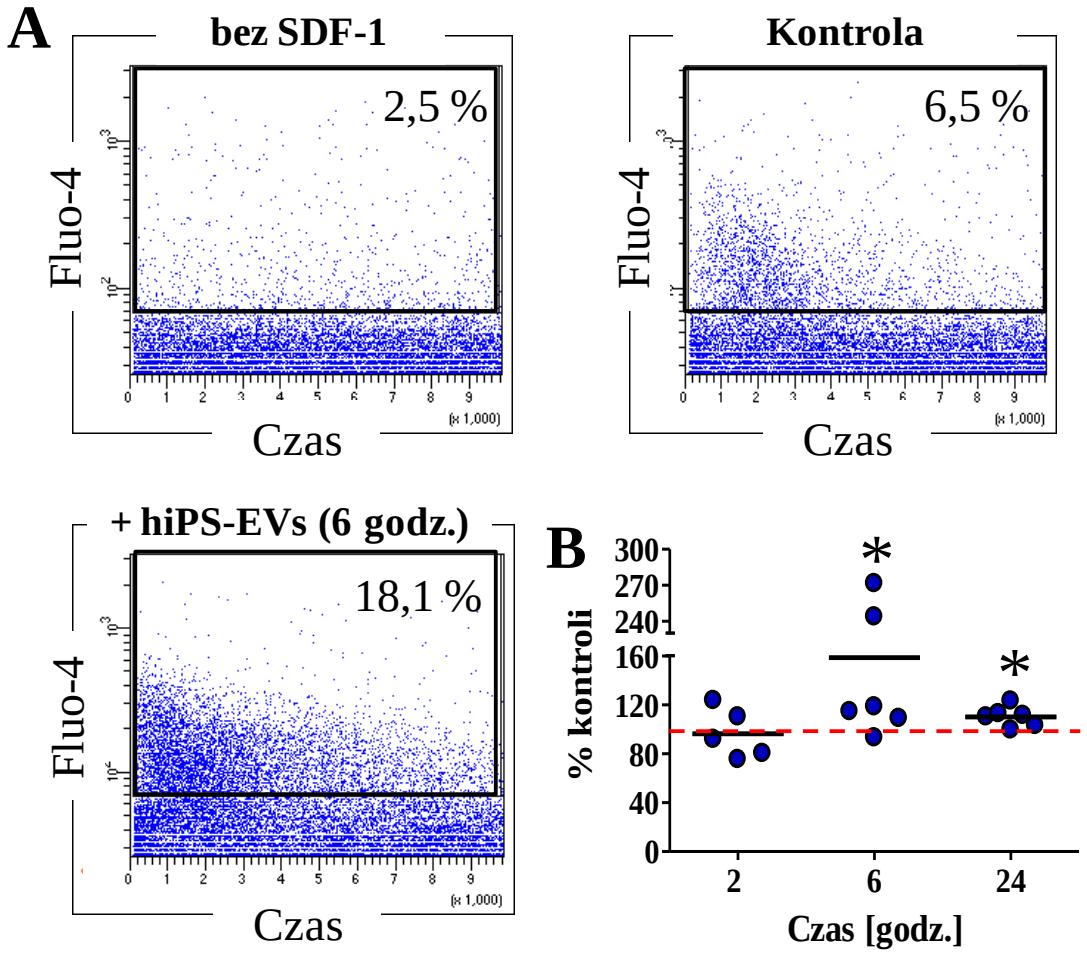


Rycina 31. Analiza wpływu hiPS-EVs na aktywność chemotaktyczną komórek $CD34^+$ z KP *in vitro*. Komórki $CD34^+$ po 7 dniach ekspansji *ex vivo* poddawano inkubacji z hiPS-EVs przez 2, 6 lub 24 godz., a następnie wysiewano na inserty komory Boydena z porami o średnicy 5 µm, zanurzone w dołkach z pożywką zawierającą SDF-1 (100 ng/ml), pozwalając na aktywną migrację komórek przez 3 godz. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane w pożywce bez hiPS-EVs. Następnie, inserty usuwano i analizowano liczbę komórek obecnych w dolnej części komory z zastosowaniem cytometru przepływowego BD LSRFortessa. **A**: Wykres aktywności chemotaktycznej komórek, wyrażonej jako % w porównaniu do kontroli, w poszczególnych punktach czasowych inkubacji z hiPS-EVs. Każdy z punktów na wykresie odpowiada pomiarowi w obrębie jednego powtórzenia eksperymentu (przy czym dla 2 godz. liczba powtórzeń wynosiła N=7, dla 6 godz. N=5, a dla 24 godz. N=6). Czarna pozioma linia wskazuje wartość średnią. Przerywaną linią czerwoną oznaczono poziom dla komórek kontrolnych (100%). *p<0,05 względem kontrolnych komórek $CD34^+$. **B:** Ekspresja antygenu CXCR4 na powierzchni komórek po inkubacji z hiPS-EVs, w porównaniu z komórkami kontrolnymi (bez hiPS-EVs), mierzona metodą cytometrii przepływowej, bezpośrednio przed wysianiem komórek na inserty. Dane na wykresie przedstawiono jako procent komórek $CXCR4^+$ (średnia ± SD; N=3) w populacji komórek po inkubacji z hiPS-EVs w porównaniu do kontroli, w poszczególnych punktach czasowych. Przerywaną linią czerwoną oznaczono poziom dla komórek kontrolnych (100%).

Mając na uwadze fakt, iż migracja komórek do SDF-1 jest regulowana m.in. poprzez interakcję tej chemokiny z jej receptorem- CXCR4, obecnym na powierzchni błony komórkowej, równolegle do pomiaru chemotaksji mierzono również ekspresję tego receptora na komórkach $CD34^+$. Co ciekawe, nie obserwowano istotnych zmian poziomu ekspresji antygenu CXCR4 na komórkach poddanych działaniu hiPS-EVs, w porównaniu do komórek kontrolnych (Rycina 31B).
Dlatego też, w toku dalszych prac zbadano czy zwiększona odpowiedź komórek $CD34^+$ na gradient chemoatraktanta po kontakcie z hiPS-EVs, może być spowodowana innymi czynnikami, w tym m.in. wpływem pęcherzyków na stężenie jonów wapnia w tych komórkach. Wynika to z faktu, że gwałtowny wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia wolnych jonów Ca^{2+}, uwalnianych z rezerwuarów komórkowych (w tym m.in. z retikulum endoplazmatycznego), jest jednym z procesów towarzyszących inicjalizacji procesów migracji komórek, w tym komórek hematopoetycznych umieszczonych w gradiencie SDF-1 (423).

Zatem, aby zbadać wpływ hiPS-EVs na wyrzut wolnych jonów wapnia (z ang. *calcium flux*) w komórkach $CD34^+$ pod wpływem stymulacji SDF-1, komórki te wstępnie inkubowano w pożywce z dodatkiem pęcherzyków przez 2, 6 lub 24 godz., a następnie, do zawiesiny komórkowej dodawano barwnika Fluo-4 AM, który ma zdolność do akumulacji w komórkach, a jego sygnał zielonej fluorescencji jest proporcjonalny do stężenia wolnych jonów Ca^{2+}. Tak przygotowane komórki stymulowano za pomocą SDF-1, natychmiast monitorując sygnał od Fluo-4 wiążącego się do jonów Ca^{2+}, z wykorzystaniem cytometru przepływowego.

Uzyskane w ten sposób wyniki wskazują, że komórki $CD34^+$ z KP reagują na obecność chemoatraktanta wzrostem stężenia wolnych jonów Ca^{2+} wewnątrz komórek, przy czym najsilniejsza reakcja ma miejsce w pierwszych sekundach od dodania SDF-1 (Rycina 32A). Co istotne, uprzednia inkubacja tych komórek z hiPS-EVs zwiększała odsetek komórek $CD34^+$ reagujących na SDF-1 wzrostem poziomu wapnia, przy czym siła tego efektu zależna była od czasu inkubacji z pęcherzykami (Rycina 32B). W szczególności, najwyższy wzrost odsetka komórek wykazujących fluorescencję od Fluo-4 (wiążącego uwolniony wapń) powyżej poziomu bazalnego (zarejestrowanego dla komórek kontrolnych bez dodatku SDF-1) zaobserwowano po 6 godz. inkubacji tych komórek z hiPS-EVs (167,2 ± 83,6 % w porównaniu do poziomu sygnału w komórkach kontrolnych). Z kolei po 2 oraz 24 godz. kontaktu komórek z pęcherzykami, poziom odpowiedzi tych komórek wynosił odpowiednio 92,8 ± 21,7 % oraz 110,08 ± 8,31 %, w porównaniu do komórek kontrolnych (Rycina 32B).



Rycina 32. Wpływ hiPS-EVs na wzrost stężenia wolnych jonów Ca^{2+} w komórkach $CD34^+$ w odpowiedzi na bodziec chemotaktyczny *in vitro*. Komórki $CD34^+$ po 7 dniach ekspansji *ex vivo* poddawano inkubacji z hiPS-EVs przez 2, 6 lub 24 godz., barwiono barwnikiem Fluo-4, a następnie stymulowano za pomocą SDF-1 (100 ng/ml). Kontrolę stanowiły komórki inkubowane w pożywce bez hiPS-EVs. Bezpośrednio po dodaniu do pożywki chemoatraktanta, rozpoczynano cytometryczny pomiar sygnału od barwnika Fluo-4, będącego wskaźnikiem wewnątrzkomórkowego stężenia wolnych jonów Ca^{2+}. Każdorazowo pomiar prowadzono przez 120 s. **A**: Reprezentatywne wykresy kropkowe sygnału od Fluo-4, rejestrowanego w czasie 120 s dla komórek w pożywce bez obecności SDF-1 (poziom bazalny), oraz komórek stymulowanych SDF-1, w tym kontrolnych oraz poddanych działaniu hiPS-EVs. Podane wartości procentowe odpowiadają odsetkowi obiektów w bramkach, w porównaniu do wszystkich komórek obecnych na danym wykresie. **B**: Wykres odsetka komórek Fluo-4^+ po dodaniu chemoatraktanta, wyrażonego jako % w porównaniu do kontroli, w poszczególnych punktach czasowych inkubacji z hiPS-EVs. Każdy z punktów na wykresie odpowiada pomiarowi w obrębie jednego powtórzenia eksperymentu, przy czym dla 2 godz. liczba powtórzeń wynosiła N=5, a dla 6 godz. oraz 24 godz. wynosiła N=6. Czarna pozioma linia wskazuje wartość średnią. Przerywaną linią czerwoną oznaczono poziom dla komórek kontrolnych (100%). *$p<0,05$ względem kontrolnych komórek $CD34^+$.

Podsumowując, otrzymane wyniki wskazują, że hiPS-EVs zwiększają odpowiedź chemotaktyczną komórek $CD34^+$ z KP na gradient SDF-1, a siła tego efektu zależy od czasu inkubacji tych komórek z hiPS-EVs. Jednocześnie, obserwowany wzrost aktywności chemotaktycznej tych komórek po ich kontakcie z hiPS-EVs nie jest spowodowany zmianami ekspresji antygenu CXCR4, ale może być częściowo związany ze wrostem stężenia wolnych jonów Ca^{2+} w tych komórkach po zadziałaniu bodźca chemotaktycznego.

4.10. Analiza wpływu hiPS-EVs na adhezję komórek $CD34^+$ *in vitro*

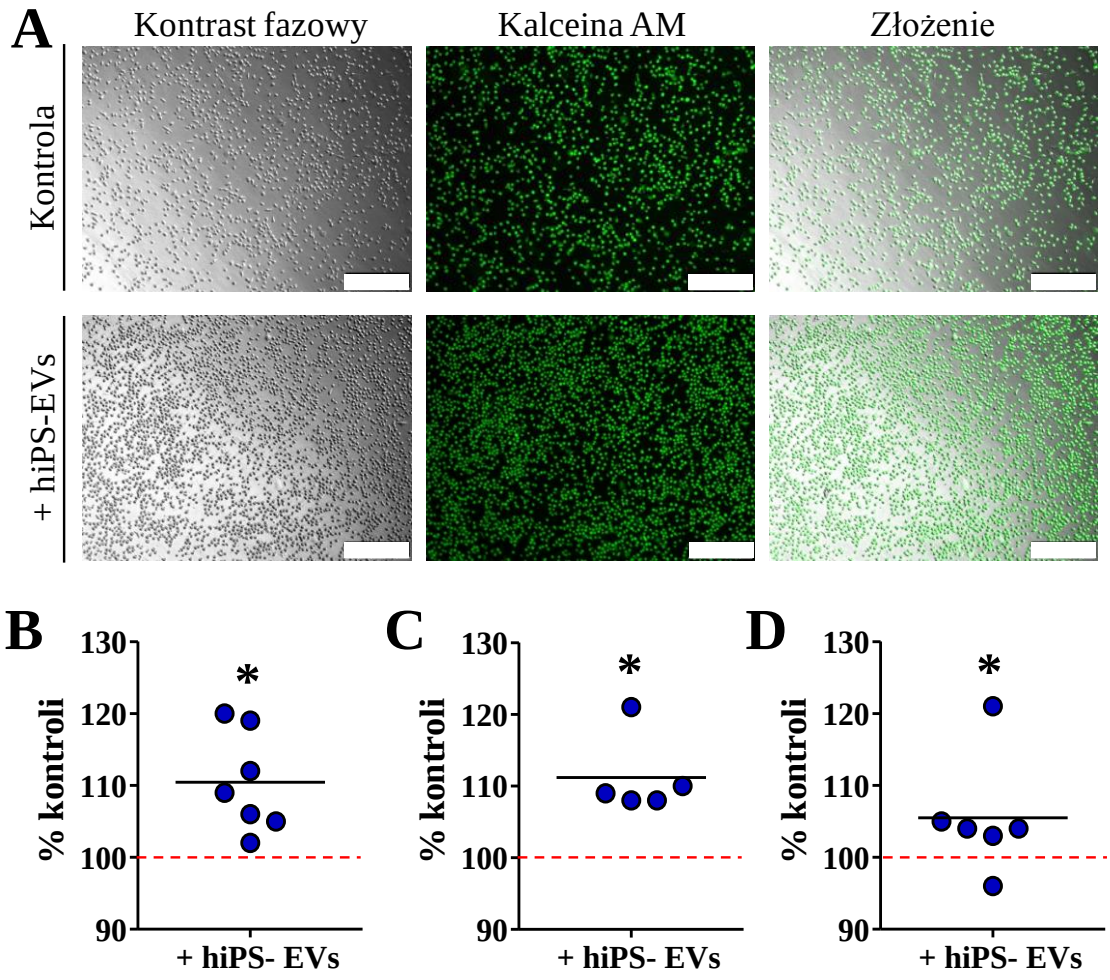
Zdolność przeszczepionych komórek HSCs do adhezji do komórek śródbłonka naczyniowego oraz komórek zrębu SzK jest kluczowym etapem niezbędnym do inicjacji przejścia tych komórek przez ściany naczyń krwionośnych i zasiedlania nisz szpikowych. Z kolei procesy te warunkują skuteczne wszczepienie komórek i rekonstytucję układu krwiotwórczego po przeszczepie (424). Dlatego, w kolejnym etapie badań oceniano czy hiPS-EVs mogą wpływać na właściwości adhezyjne komórek $CD34^+$ izolowanych z KP.

W tym celu komórki $CD34^+$ inkubowano w pożywce z dodatkiem pęcherzyków przez 2 godz., a następnie przeprowadzano test ich adhezji do różnych powierzchni, wysiewając komórki wyznakowane kalceiną AM na naczynia hodowlane, pokryte fibronektyną, warstwą komórek stromalnych lub komórkami pochodzenia śródbłonkowego. Taki czas inkubacji komórek HSCs z hiPS-EVs dobrano bazując na wynikach wcześniejszych eksperymentów, świadczących, że do efektywnej stymulacji szeregu funkcji komórek dochodzi po krótkim czasie ich kontaktu z pęcherzykami.

W pierwszej kolejności badano potencjał komórek $CD34^+$ do przylegania do fibronektyny- białka będącego istotnym składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej (425). Zaobserwowano, że krótka inkubacja z hiPS-EVs (2 godz.) zwiększa adhezję komórek $CD34^+$ do fibronektyny o 10,0 ± 0,8 % w porównaniu do komórek kontrolnych, niepoddanych działaniu pęcherzyków (Rycina 33A-B). Następnie, analizowano także efekt dodatku pęcherzyków na przyleganie komórek krwiotwórczych z KP do dwóch typów komórek adherentnych: komórek mezenchymalnych oraz komórek śródbłonka, które stanowią odpowiednio – istotny element zrębu SzK oraz reprezentują komórki wyścielające naczynia. Jako układy modelowe zastosowano odpowiednio komórki UC-MSCs oraz HUVECs. Podobnie jak w przypadku fibronektyny, wykazano wzrost adhezji komórek $CD34^+$, zarówno do UC-MSCs (o 11,0 ± 0,6% w porównaniu do komórek kontrolnych; Rycina 33C), jak i HUVECs (o 6,0 ± 0,8 % w porównaniu do komórek kontrolnych; Rycina 33D).

Następnie, w celu zbadania możliwych mechanizmów odpowiedzialnych za obserwowany wpływ hiPS-EVs na interakcję komórek HSCs z macierzą białkową oraz innymi komórkami, sprawdzano czy inkubacja komórek $CD34^+$ z hiPS-EVs wpływa na obecność antygenów zaangażowanych w adhezję komórek krwiotwórczych do śródbłonka naczyniowego oraz białek ECM, a tym samym uczestniczących w zasiedlaniu przez nie nisz hematopoetycznych po przeszczepie (147). Analizowano

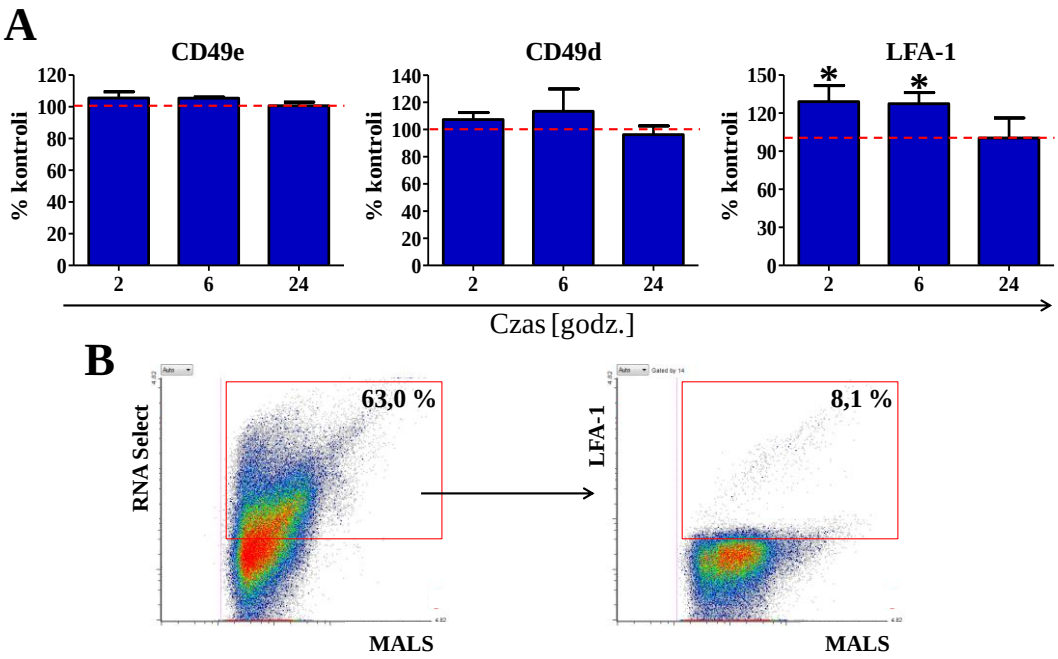
m.in. ekspresję antygenów CD49d oraz LFA-1 na komórkach CD34$^+$ poddanych działaniu hiPS-EVs, będących odpowiednio ligandami dla VCAM-1 oraz cząsteczki adhezji międzykomórkowej 1 (ang. *intercellular adhesion molecule 1*; ICAM-1) obecnych na komórkach śródbłonka (147, 426). Jednocześnie, badano także ekspresję antygenu CD49e, jako ligandu dla fibronektyny (427).



Rycina 33. Wpływ hiPS-EVs na zdolność komórek CD34$^+$ z KP do adhezji do fibronektyny oraz do komórek stromalnych i komórek śródbłonka. Komórki CD34$^+$ po 7 dniach ekspansji *ex vivo* poddawano inkubacji z hiPS-EVs przez 2 godz. i barwiono kalceiną AM. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane w pożywce bez pęcherzyków. Następnie komórki umieszczano w dołkach hodowlanych, pokrytych warstwą fibronektyny, komórkami UC-MSCs lub HUVECs, a następnie po 2,5 godz. inkubacji odpłukiwano niezwiązane komórki i dokonywano pomiaru sygnału fluorescencji kalceiny, za pomocą czytnika płytkowego Tecan. **A**: Reprezentatywne zdjęcia komórek CD34$^+$ zaadherowanych do fibronektyny, wykonane za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego Leica DMI6000B w kontraście faz, kanale zielonej fluorescencji oraz jako złożenie obu kanałów. Pasek skali oznacza 250 µm. Na wykresach przedstawiono wartości sygnału fluorescencji pochodzącej od komórek CD34$^+$ zaadherowanych do fibronektyny (N=7, panel **B**), komórek UC-MSCs (N=5, panel **C**) lub HUVECs (N=6, panel **D**), wyrażonego jako % w porównaniu do komórek kontrolnych. Każdy z punktów na wykresie odpowiada pomiarowi w obrębie jednego powtórzenia eksperymentu. Czarna pozioma linia wskazuje wartość średnią. Przerywaną linią czerwoną oznaczono poziom dla komórek kontrolnych (100%). *p<0,05 względem kontrolnych komórek CD34$^+$.

Otrzymane wyniki wskazują, że krótka inkubacja komórek CD34$^+$ z hiPS-EVs nie wpływa na ekspresję antygenów CD49d oraz CD49e (Rycina 34A). Jednakże, zaobserwowano istotny statystycznie wzrost poziomu ekspresji antygenu LFA-1 w komórkach inkubowanych z pęcherzykami przez 2 godz. oraz 6 godz. (odpowiednio 129,0 ± 12,6 % oraz 127,4 ± 8,7 % w porównaniu do poziomu zmierzonego w komórkach kontrolnych; Rycina 34A). Co istotne, po 24 godz. inkubacji z hiPS-EVs ekspresja tego antygenu powróciła do poziomu obserwowanego dla komórek kontrolnych.

W celu zbadania możliwego mechanizmu zmiany poziomu antygenu LFA-1 na komórkach CD34$^+$ poddanych działaniu hiPS-EVs, przeprowadzono również analizę obecności LFA-1 na hiPS-EVs z zastosowaniem wysokorozdzielczej cytometrii przepływowej. Badano w ten sposób czy obecność tego antygenu na powierzchni komórek CD34$^+$ może być potencjalnie wynikiem jego przeniesienia z błony pęcherzyków do błony HSCs. Otrzymane dane wskazują, że 8,1 ± 0,2 % pęcherzyków RNA Select$^+$ posiada ten marker na swojej powierzchni (Rycina 34B). Świadczyć to może o prawdopodobieństwie przeniesienia go na komórki CD34$^+$ w wyniku ich interakcji z hiPS-EVs. Jednakże, zważywszy na fakt, że odsetek LFA-1$^+$ hiPS-EVs jest relatywnie niski, istnieje także możliwość, że sam kontakt z pęcherzykami może indukować endogenną reakcję komórek, prowadzącą do wzrostu poziomu tego antygenu na ich powierzchni.



Rycina 34. Analiza wpływu hiPS-EVs na ekspresję wybranych molekuł adhezyjnych na komórkach CD34$^+$ z KP. A: Komórki CD34$^+$ po 7 dniach ekspansji *ex vivo* poddawano inkubacji z hiPS-EVs przez 2, 6 lu 24 godz. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane w pożywce bez pęcherzyków. Następnie, komórki barwiono odpowiednimi przeciwciałami przeciwko wybranym molekułom adhezyjnym: CD49d, CD49e oraz LFA-1, sprzężonymi z fluorochromami. Średnią intensywność fluorescencji (z ang. *median fluorescencje intensity;* MFI) emitowaną od związanych z komórkami przeciwciał mierzono za pomocą cytometru przepływowego BD LSRFortessa. Na wykresach przedstawiono MFI (średnia ± SD; N=3)

wyrażone jako % w porównaniu do jego wartości dla komórek kontrolnych, w poszczególnych punktach czasowych inkubacji z hiPS-EVs. Przerywaną linią czerwoną oznaczono poziom dla komórek kontrolnych (100%). *p<0,05 względem kontrolnych komórek $CD34^+$. **B**: Analiza obecności antygenu LFA-1 na hiPS-EVs. Próbki hiPS-EVs barwiono immunofluorescencyjnie oraz za pomocą barwnika RNA Select i analizowano za pomocą cytometru przepływowego Apogee A50-Micro oraz dedykowanego oprogramowania Histogram. Reprezentatywne wykresy kropkowe ekspresji antygenu LFA-1 na hiPS-EVs pozytywnych dla RNA Select. Wykresy przedstawiają poziom sygnału w odpowiednich kanałach detekcji fluorescencji względem parametru rozproszenia światła MALS (z ang. *medium angle light scatter*), proporcjonalnego do względnej wielkości analizowanych cząstek. Podane wartości procentowe odpowiadają odsetkowi obiektów w czerwonych obszarach (bramkach), w porównaniu do wszystkich cząstek obecnych na danym wykresie. Położenie bramek dostosowano do poziomu autofluorescencji w poszczególnych kanałach detekcji, zmierzonego dla próbki niebarwionej.

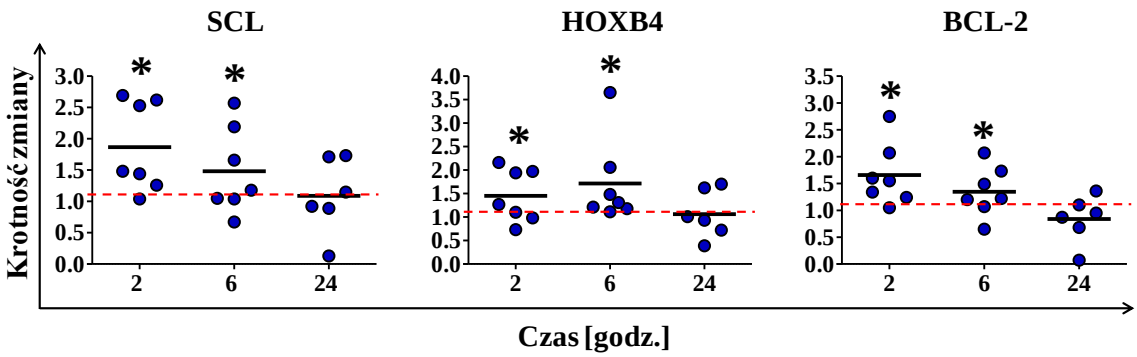
Podsumowując, hiPS-EVs mogą pozytywnie wpływać na adhezję komórek $CD34^+$ z KP do białek ECM, a także komórek stromalnych i śródbłonka naczyniowego, a mechanizm tego zjawiska może być częściowo związany ze zwiększeniem poziomu ekspresji antygenu LFA-1 na komórkach krwiotwórczych, zaangażowanego m.in. w procesy adhezji międzykomórkowej.

4.11. Ocena ekspresji genów związanych z hematopoezą w komórkach $CD34^+$ z KP poddanych działaniu hiPS-EVs *in vitro*

W toku prowadzonych badań, uzyskane wyniki świadczące o wielokierunkowym wpływie hiPS-EVs na funkcje komórek $CD34^+$ z KP *in vitro*, nasunęły pytania o możliwe mechanizmy molekularne obserwowanych zjawisk. Dotychczasowe prace badawcze, w tym prace naszego zespołu, wskazują, że jednym z efeków działania EVs może być zmiana ekspresji genów w komórkach docelowych (396, 428, 429). Ponadto, obserwowany w niniejszej pracy wpływ hiPS-EVs na szereg właściwości biologicznych komórek krwiotwórczych z KP sugerował, że może dochodzić w nich do zmiany poziomu genów regulujących wymienione procesy. Dlatego, w kolejnym etapie badań poddano analizie zawartość mRNA dla wybranych genów obecnych w komórkach $CD34^+$ poddanych działaniu hiPS-EVs.

Początkowo, zbadano zmiany poziomu transkryptów dla dwóch istotnych genów hematopoetycznych: SCL oraz HOXB4 (430, 431) w komórkach poddanych krótkiej inkubacji z hiPS-EVs. Istotnie, analiza z zastosowaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym wykazała, że dodatek hiPS-EVs do pożywki hodowlanej zwiększa ekspresję mRNA dla genu SCL w komórkach $CD34^+$, osiągając 1,8 ± 0,7- krotny oraz 1,5 ± 0,7-krotny wzrost w porównaniu do komórek kontrolnych, odpowiednio po 2 godz. oraz 6 godz. inkubacji z hiPS-EVs (Rycina 35). Jednakże, po 24 godz. inkubacji z pęcherzykami ekspresja tego genu wracała do poziomu bazalnego, odpowiadającego komórkom kontrolnym. Podobnie, ekspresja genu HOXB4 również istotnie wzrastała w komórkach po 2 godz. i 6 godz. inkubacji z hiPS-EVs, odpowiednio 1,5 ± 0,6-krotnie i 1,7 ± 0,9- krotnie. Dodatkowo, poziom antyapoptotycznego genu BCL-2 (432)

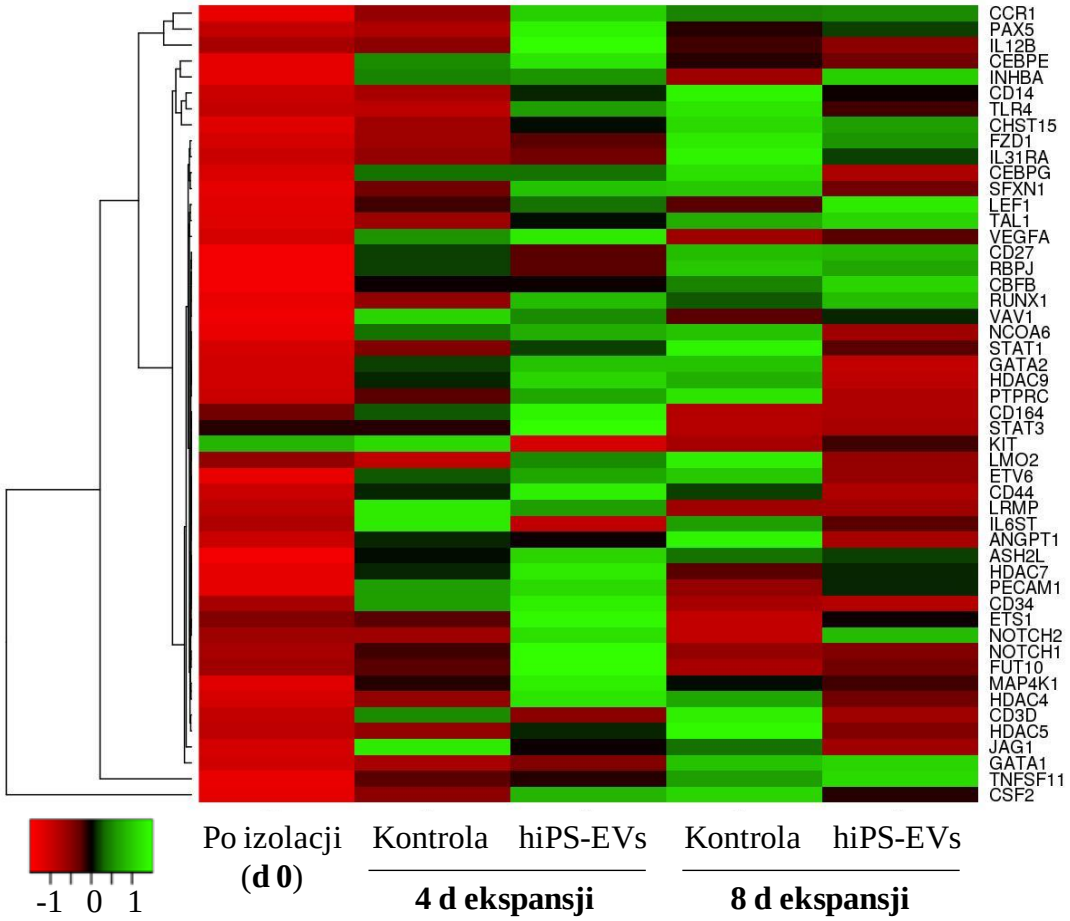
był również podwyższony w komórkach CD34$^+$ traktowanych hiPS-EVs, odpowiednio 1,7 ± 0,6- krotnie i 1,4 ± 0,5- krotnie po 2 godz. i 6 godz. od momentu dodania pęcherzyków (Rycina 35).



Rycina 35. Analiza poziomu ekspresji wybranych genów w komórkach CD34$^+$ poddanych działaniu hiPS-EVs *in vitro*. Komórki CD34$^+$ po 7 dniach ekspansji *ex vivo* poddawano inkubacji z hiPS-EVs przez 2, 6 lub 24 godz. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane w pożywce bez pęcherzyków. Następnie, badano zmianę poziomu transkryptów dla genów SCL, HOXB4 oraz BCL-2, z zastosowaniem metody PCR w czasie rzeczywistym. Na wykresach przedstawiono poziom badanych transkryptów w komórkach poddanych działaniu hiPS-EVs, w poszczególnych punktach czasowych inkubacji z pęcherzykami. Dane wyrażono jako krotność zmiany w porównaniu do poziomu w komórkach kontrolnych, który przyjęto jako wartość równą 1 i oznaczono przerywaną linią czerwoną. Każdy z punktów na wykresie odpowiada pomiarowi w obrębie jednego powtórzenia eksperymentu, przy czym dla 2 godz. oraz 6 godz. liczba powtórzeń wynosiła N=7, a dla 24 godz. N=6. Czarna pozioma linia wskazuje wartość średnią. *p<0,05 względem komórek kontrolnych.

W dalszej części badań przeprowadzono analizę zmian profilu ekspresji szeregu genów zaangażowanych w regulację funkcji hematopetycznych w komórkach CD34$^+$ z KP, poddanych ekspansji *ex vivo*. W tym celu, badano zawartość mRNA w komórkach w 4 oraz 8 dniu ich namnażania w obecności hiPS-EVs, porównując ją do komórek kontrolnych, tj. hodowanych w pożywce bez pęcherzyków. Zastosowanie komercyjnych zestawów do profilowania mRNA dla genów związanych z procesem hematopoezy umożliwiło analizę zmian poziomu transkryptów dla kilkudziesięciu genów, ulegających zróżnicowanej ekspresji w komórkach HSCs bezpośrednio po izolacji z KP oraz w toku ich namnażania w hodowli *ex vivo*.

Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić zróżnicowany poziom badanych mRNA w komórkach w poszczególnych dniach ich ekspansji. Analiza z zastosowaniem wizualizacji typu *heatmap* umożliwiła zaobserwowanie unikatowego profilu ekspresji transkryptów obecnych w namnażanych komórkach (Rycina 36). Na szczególną uwagę zasługuje fakt wyraźnie odmiennego wzoru badanego transkryptomu w komórkach CD34$^+$ poddanych analizie bezpośrednio po izolacji, w porównaniu do dynamicznych zmian w poziomie poszczególnych genów w komórkach namnażanych *ex vivo* (pomimo, że namnażanie prowadzono w pożywce dedykowanej ekspansji wczesnych komórek HSCs z zachowaniem ich pierwotnego fenotypu).



Ryc. 36. Analiza poziomu ekspresji wybranych genów w komórkach CD34$^+$ poddanych ekspansji *ex vivo* w pożywce zawierającej hiPS-EVs. Po izolacji komórki hodowano w dedykowanej pożywce do ekspansji HSCs, zawierającej dodatek hiPS-EVs (2 µg/ml). Kontrolę stanowiły komórki hodowane w pożywce bez pęcherzyków. Następnie, w 4 oraz 8 dniu ekspansji badano poziom transkryptów dla genów związanych z procesem hematopoezy, z zastosowaniem komercyjnych zestawów Hematopoiesis RT^2 Profiler PCR Array. Analizę przeprowadzono również dla komórek CD34$^+$ niepoddanych ekspansji (bezpośrednio po izolacji, d 0). Względny poziom analizowanych genów przedstawiono w postaci obrazu typu *heatmap*, wygenerowanego za pomocą narzędzia *Heatmapper*. Skala kolorystyczna odpowiada względnemu, średniemu poziomowi ekspresji w poszczególnych typach próbek, od relatywnie najniższego (czerwony) do najwyższego (zielony), na podstawie generowanej przez narzędzie skali dla parametru *Row Z-Score*, przyjmującego wartości od -1 do 1. Średnią poziomu ekspresji w poszczególnych typach próbek obliczono na podstawie danych uzyskanych dla trzech (N=3) powtórzeń eksperymentu.

Dodatkowo, przeprowadzona analiza wykazała, że ekspresja większości badanych genów ulega zwiększeniu w komórkach poddanych ekspansji, w porównaniu do poziomu dla komórek po izolacji (Rycina 36, Tabela 19). Wyjątek stanowiły geny: LMO2 oraz STAT3 w 4 dniu ekspansji oraz geny: STAT3, CD164, NOTCH2, KIT, ETS1, FUT10 oraz CD34 w 8 dniu ekspansji, których ekspresja była niższa, w porównaniu do poziomu obecnego w komórkach przed rozpoczęciem ich hodowli *ex vivo*.

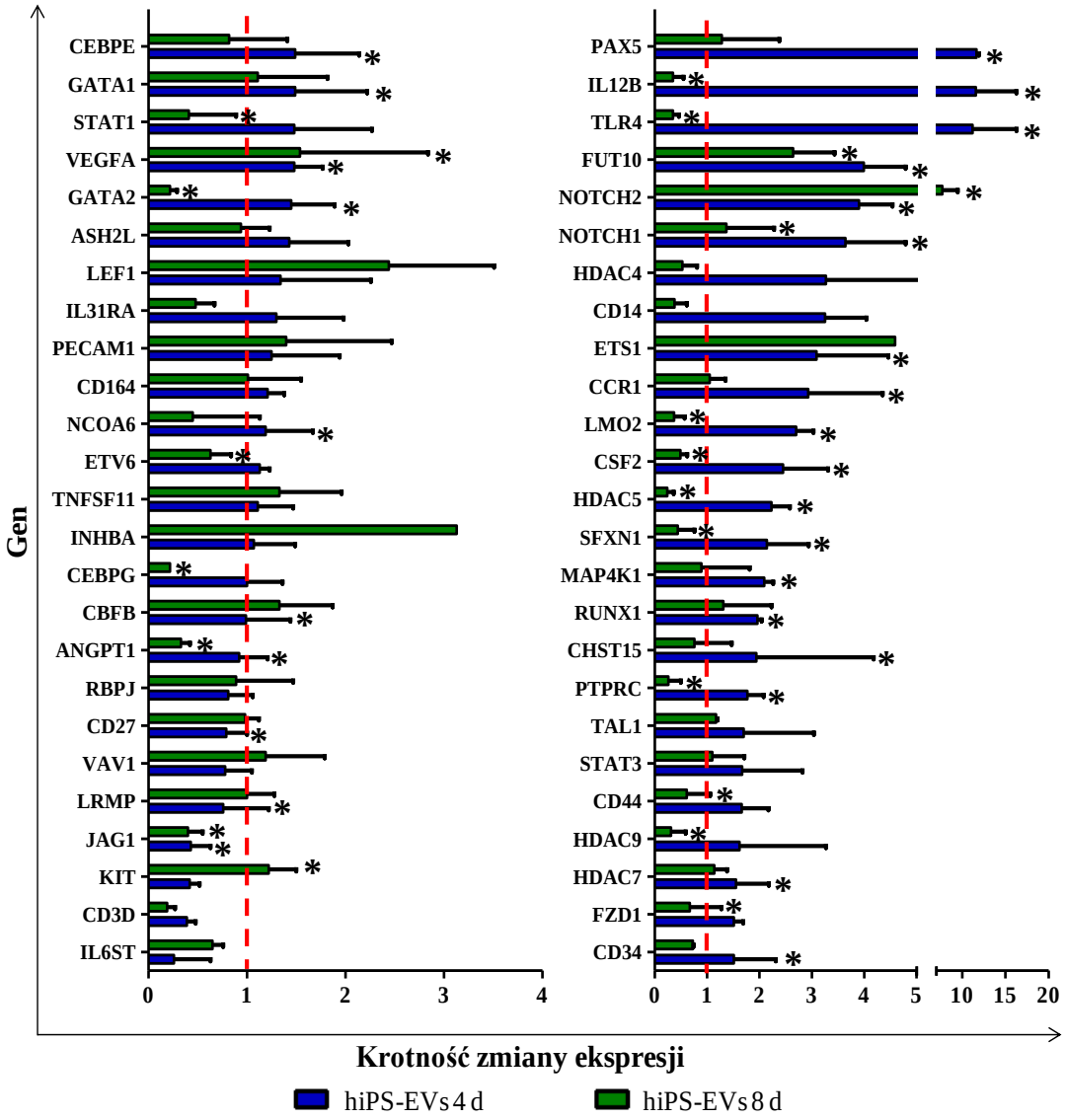
Tabela 19. Zbiorcze zestawienie zmian poziomu ekspresji wybranych genów w komórkach CD34$^+$ poddanych ekspansji *ex vivo* w pożywce zawierającej hiPS-EVs. Po izolacji komórki hodowano w dedykowanej pożywce, zawierającej dodatek hiPS-EVs (2 µg/ml). Kontrolę stanowiły komórki hodowane w pożywce bez pęcherzyków. Następnie, w 4 oraz 8 dniu ekspansji badano poziom transkryptów dla genów związanych z procesem hematopoezy, z zastosowaniem komercyjnych zestawów Hematopoiesis RT^2 Profiler PCR Array. Analizę przeprowadzono również dla komórek niepoddanych ekspansji (bezpośrednio po izolacji, d 0). W tabeli zestawiono wartości średnie ± SD (N=3) krotności zmiany poziomu badanych transkryptów w komórkach CD34$^+$, w poszczególnych punktach czasowych ekspansji, uwzględniając dane dla komórek poddanych działaniu hiPS-EVs oraz kontrolnych. Dane wyrażono jako krotność zmiany w porównaniu do poziomu w komórkach niepoddanych ekspansji (bezpośrednio po izolacji), który przyjęto jako wartość równą 1.

Gen	4 dzień ekspansji		8 dzień ekspansji	
	Kontrola	+ hiPS-EVs	Kontrola	+ hiPS-EVs
	Średnia ± SD	Średnia ± SD	Średnia ± SD	Średnia ± SD
LMO2	0,68 ± 0,32	1,84 ± 0,23	2,74 ± 0,55	1,00 ± 0,54
STAT3	0,99 ± 0,28	1,64 ± 1,13	0,73 ± 0,41	0,80 ± 0,44
CD164	1,10 ± 0,26	1,34 ± 0,18	0,91 ± 0,09	0,92 ± 0,50
NOTCH2	1,10 ± 0,41	4,31 ± 0,70	0,46 ± 0,62	3,56 ± 0,82
KIT	1,13 ± 0,10	0,47 ± 0,11	0,60 ± 0,16	0,73 ± 0,17
ETS1	1,19 ± 0,82	3,66 ± 1,63	0,32 ± 0,00	1,47 ± 0,00
FUT10	2,03 ± 1,83	8,10 ± 1,62	0,69 ± 0,00	1,83 ± 0,55
CD44	2,04 ± 0,41	3,39 ± 1,03	2,13 ± 1,14	1,29 ± 0,95
ETV6	2,04 ± 0,55	2,31 ± 0,20	2,51 ± 0,45	1,58 ± 0,54
HDAC7	2,43 ± 0,69	3,76 ± 1,52	2,12 ± 0,91	2,42 ± 0,50
ANGPT1	2,54 ± 0,98	2,33 ± 0,73	4,56 ± 3,83	1,49 ± 0,42
PTPRC	2,62 ± 0,91	4,63 ± 0,82	6,06 ± 4,98	1,56 ± 1,48
ASH2L	2,65 ± 1,20	3,79 ± 1,60	2,97 ± 0,41	2,80 ± 0,87
LRMP	2,92 ± 2,12	2,21 ± 1,35	1,25 ± 0,00	1,26 ± 0,34
RUNX1	2,99 ± 0,64	5,87 ± 0,23	4,50 ± 2,73	5,92 ± 4,16
HDAC5	3,09 ± 1,02	6,90 ± 1,07	16,45 ± 7,55	3,87 ± 2,01
IL6ST	3,09 ± 4,08	0,79 ± 1,14	2,26 ± 1,59	1,48 ± 0,25
NOTCH1	3,16 ± 3,22	11,49 ± 3,65	1,68 ± 2,18	2,31 ± 1,53
STAT1	3,18 ± 2,07	4,71 ± 2,50	8,56 ± 8,25	3,53 ± 4,11
CD34	3,36 ± 1,58	5,06 ± 2,70	0,98 ± 0,59	0,71 ± 0,01
HDAC9	3,56 ± 0,00	5,75 ± 5,86	4,80 ± 5,53	1,47 ± 1,35
PECAM1	3,74 ± 1,17	4,66 ± 2,60	2,23 ± 1,41	3,11 ± 2,39

HDAC4	3,83 ± 3,26	12,53 ± 7,53	9,47 ± 7,37	4,98 ± 2,62
GATA2	4,26 ± 1,32	6,18 ± 1,89	6,22 ± 2,94	1,38 ± 0,45
CBFB	4,34 ± 2,06	4,31 ± 1,95	5,28 ± 1,25	6,99 ± 2,87
TAL1	4,68 ± 3,38	7,96 ± 6,28	11,99 ± 2,62	14,02 ± 0,40
RBPJ	5,21 ± 3,13	4,21 ± 1,29	7,16 ± 5,44	6,36 ± 4,14
CD27	5,23 ± 1,79	4,14 ± 1,09	6,94 ± 2,29	6,81 ± 0,99
MAP4K1	5,45 ± 0,75	11,39 ± 0,95	5,93 ± 4,60	5,26 ± 5,48
NCOA6	5,55 ± 1,79	6,61 ± 2,69	7,18 ± 3,38	3,25 ± 4,86
IL31RA	6,08 ± 2,85	7,92 ± 4,11	27,15 ± 11,14	12,94 ± 5,04
VAV1	6,11 ± 5,76	4,74 ± 1,63	3,44 ± 1,52	4,08 ± 2,08
FZD1	8,46 ± 4,29	12,77 ± 1,55	34,79 ± 20,44	23,45 ± 21,05
CD3D	10,00 ± 6,60	3,93 ± 0,90	16,66 ± 0,00	3,12 ± 1,27
LEF1	10,25 ± 5,99	13,75 ± 9,46	9,38 ± 5,37	22,86 ± 10,06
TLR4	10,36 ± 1,94	116,04 ± 52,69	172,33 ± 5,94	60,18 ± 19,01
GATA1	12,05 ± 6,22	17,92 ± 8,78	52,11 ± 17,63	57,83 ± 36,91
SFXN1	13,38 ± 7,74	28,59 ± 10,73	29,25 ± 16,44	12,99 ± 9,43
VEGFA	15,71 ± 6,06	23,23 ± 4,49	5,84 ± 5,32	8,99 ± 7,57
CEBPG	20,05 ± 9,86	20,09 ± 7,14	31,61 ± 27,38	7,06 ± 0,12
CD14	27,25 ± 5,21	88,64 ± 21,40	211,20 ± 152,92	80,02 ± 48,25
CHST15	29,47 ± 12,06	57,12 ± 66,11	105,37 ± 66,84	80,57 ± 74,30
PAX5	41,99 ± 28,62	489,57 ± 10,96	165,27 ± 69,72	211,07 ± 182,21
JAG1	50,08 ± 33,47	21,55 ± 10,15	28,83 ± 18,28	11,64 ± 4,41
IL12B	51,70 ± 45,30	598,54 ± 242,71	122,58 ± 83,12	43,37 ± 24,16
INHBA	89,20 ± 23,05	95,42 ± 37,10	38,98 ± 0,00	122,03 ± 0,00
CEBPE	120,57 ± 43,73	179,47 ± 78,51	83,49 ± 42,73	68,41 ± 49,42
CCR1	121,45 ± 8,60	356,23 ± 172,15	252,90 ± 16,35	266,65 ± 76,00
TNFSF11	304,51 ± 128,71	339,38 ± 110,18	521,94 ± 128,60	693,84 ± 331,04
CSF2	472,72 ± 159,95	1159,05 ± 408,33	1360,38 ± 77,64	663,10 ± 170,34

Jednocześnie, już wstępna ocena wykresu typu *heatmap* pozwoliła stwierdzić, że dodatek hiPS-EVs do pożywki namnażającej wpływa istotnie na poziom poszczególnych transkryptów w komórkach HSCs (Rycina 36). Poszerzona analiza ilościowa wykazała, że spośród 50 badanych genów, w przypadku aż 28 z nich dochodzi o statystycznie istotnej zmiany poziomu ekspresji w komórkach w 4 dniu ich ekspansji *ex vivo* w obecności hiPS-EVs, w porównaniu do komórek namnażanych w pożywce bez dodatku pęcherzyków, przy czym dla 4 genów zaobserwowano spadek,

a dla 24 genów wzrost ich ekspresji (Rycina 37, Tabela 20). Z kolei w 8 dniu hodowli zmiany te były mniejsze, a jedynie 5 genów wykazywało istotnie statystycznie wyższą ekspresję w komórkach namnażanych w pożywce z hiPS-EVs, przy jednoczesnym obniżeniu poziomu 16 innych transkryptów (Rycina 37, Tabela 20). Co istotne, wspólnymi dla obu punktów czasowych genami, których ekspresja w namnażanych komórkach zwiększała się pod wpływem obecności hiPS-EVs były NOTCH1, NOTCH2 oraz VEGFA.



Rycina 37. Analiza wpływu hiPS-EVs na ekspresję wybranych genów w komórkach CD34$^+$ poddanych ekspansji *ex vivo*. Po izolacji komórki hodowano w dedykowanej pożywce, zawierającej dodatek hiPS-EVs (2 µg/ml). Kontrolę stanowiły komórki hodowane w pożywce bez pęcherzyków. W 4 oraz 8 dniu ekspansji badano poziom transkryptów dla genów związanych z procesem hematopoezy, z zastosowaniem komercyjnych zestawów Hematopoiesis RT^2 Profiler PCR Array. Na wykresach przedstawiono średnią ± SD (N=3) poziomu badanych transkryptów w komórkach poddanych działaniu hiPS-EVs, w poszczególnych punktach czasowych inkubacji z pęcherzykami. Dane wyrażono jako krotność zmiany w porównaniu do poziomu w komórkach kontrolnych, który przyjęto jako wartość równą 1 i oznaczono przerywaną linią czerwoną. *p<0,05 względem komórek kontrolnych.

Spośród genów, których ekspresja ulega zwiększeniu w 4 dniu ekspansji w komórkach hodowanych w pożywce zawierającej hiPS-EVs (w porównaniu z komórkami kontrolnymi), największy wzrost poziomu transkryptu miał miejsce w przypadku genu PAX5 (11,66 ± 0,26 - krotny wzrost w porównaniu do komórek kontrolnych), kodującego czynnik transkypcyjny odgrywający kluczową rolę w regulacji rozwoju linii limfocytów B (433).

Innymi genami, dla których poziom transkryptów zwiększał się w obecności hiPS-EVs były m.in. **NOTCH1** oraz **NOTCH2** (odpowiednio 3,64 ± 1,15 oraz 3,90 ± 0,64 - krotny wzrost w porównaniu do komórek kontrolnych) uczestniczące w kontroli samoodnowy i różnicowania komórek hematopoetycznych (434), **FUT10** (3,99 ± 0,80- krotny wzrost w porównaniu do komórek kontrolnych) kodujący enzym fukozylotransferazę 10 (435), mogącą modyfikować czynniki adhezji na komórkach krwiotwórczych (262) oraz geny dla deacetylaz histonowych **HDAC5** oraz **HDAC7** (odpowiednio 2,23 ± 0,35 oraz 1,55 ± 0,63 - krotny wzrost w porównaniu do kontroli) regulujących status epigenetyczny komórek (436).

Uzyskane wyniki wskazują również na zwiększenie ekspresji genów dla czynników transkrypcyjnych takich jak **RUNX1, GATA1** oraz **GATA2** (odpowiednio 1,96 ± 0,08; 1,49 ± 0,73 oraz 1,45 ± 0,44 - krotny wzrost w porównaniu do komórek kontrolnych), będących regulatorami liczby HSCs oraz kierunkowości ich różnicowania (437, 438). Ponadto, obserwowano również wzrost poziomu genów pośredniczących w aktywności chemotaktycznej komórek HSCs, w tym m.in. genu **CCR1** (2,93 ± 1,42- krotny wzrost w porównaniu do kontroli) kodującego receptor dla chemokiny CCL3 (439) (Rycina 37, Tabela 20).

Tabela 20. Zbiorcze zestawienie analizy wpływu hiPS-EVs na ekspresję wybranych genów w komórkach CD34$^+$ poddanych ekspansji *ex vivo*. Po izolacji komórki hodowano w dedykowanej pożywce, zawierającej dodatek hiPS-EVs (2 µg/ml). Kontrolę stanowiły komórki hodowane w pożywce bez pęcherzyków. W 4 oraz 8 dniu ekspansji badano poziom transkryptów dla genów związanych z procesem hematopoezy, z zastosowaniem komercyjnych zestawów Hematopoiesis RT^2 Profiler PCR Array. Dane w tabeli przedstawiono jako średnią ± SD (N=3) krotności zmiany poziomu wybranych transkryptów w komórkach poddanych działaniu hiPS-EVs, w porównaniu do poziomu w komórkach kontrolnych, który przyjęto jako wartość równą 1. W tabeli uwzględniono tylko te geny, dla których zmiana ekspresji była istotna statystycznie (*p<0,05 względem komórek kontrolnych). Kolorem czerwonym zaznaczono geny o obniżonej ekspresji (krotność zmiany<1), a kolorem zielonym geny ulegające nadekspresji, w porównaniu do komórek kontrolnych (krotność zmiany>1).

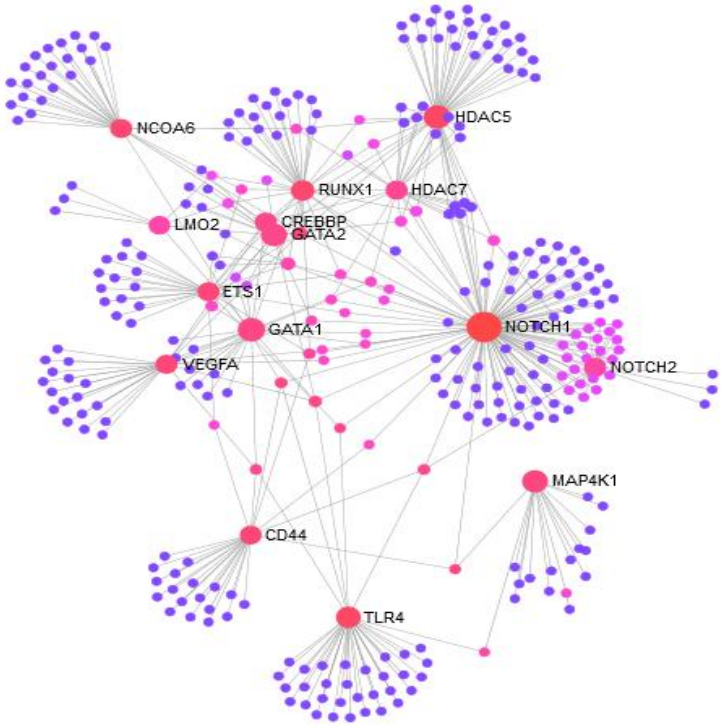
4 dzień ekspansji z hiPS-EVs		8 dzień ekspansji z hiPS-EVs	
Gen	**Krotność zmiany ekspresji** Średnia ± SD	**Gen**	**Krotność zmiany ekspresji** Średnia ± SD
JAG1	0,43 ± 0,20	**GATA2**	0,22 ± 0,07
LRMP	0,76 ± 0,46	**CEBPG**	0,22 ± 0,00
CD27	0,79 ± 0,21	**HDAC5**	0,24 ± 0,12

ANGPT1	0,92 ± 0,29	**PTPRC**	0,26 ± 0,24
NCOA6	1,19 ± 0,48	**HDAC9**	0,31 ± 0,28
GATA2	1,45 ± 0,44	**ANGPT1**	0,33 ± 0,09
VEGFA	1,48 ± 0,29	**TLR4**	0,35 ± 0,11
GATA1	1,49 ± 0,73	**IL12B**	0,35 ± 0,20
CEBPE	1,49 ± 0,65	**LMO2**	0,37 ± 0,20
CD34	1,51 ± 0,80	**JAG1**	0,40 ± 0,15
HDAC7	1,55 ± 0,63	**STAT1**	0,41 ± 0,48
CD44	1,66 ± 0,51	**SFXN1**	0,44 ± 0,32
PTPRC	1,77 ± 0,31	**CSF2**	0,49 ± 0,13
CHST15	1,94 ± 2,24	**CD44**	0,61 ± 0,45
RUNX1	1,96 ± 0,08	**ETV6**	0,63 ± 0,21
MAP4K1	2,09 ± 0,17	**FZD1**	0,67 ± 0,60
SFXN1	2,14 ± 0,80	**KIT**	1,22 ± 0,28
HDAC5	2,23 ± 0,35	**CBFB**	1,33 ± 0,54
CSF2	2,45 ± 0,86	**NOTCH1**	1,37 ± 0,91
LMO2	2,70 ± 0,33	**VEGFA**	1,54 ± 1,30
CCR1	2,93 ± 1,42	**NOTCH2**	7,70 ± 1,77
ETS1	3,09 ± 1,37		
NOTCH1	3,64 ± 1,15		
NOTCH2	3,90 ± 0,64		
FUT10	3,99 ± 0,80		
TLR4	11,20 ± 5,09		
IL12B	11,58 ± 4,69		
PAX5	11,66 ± 0,26		

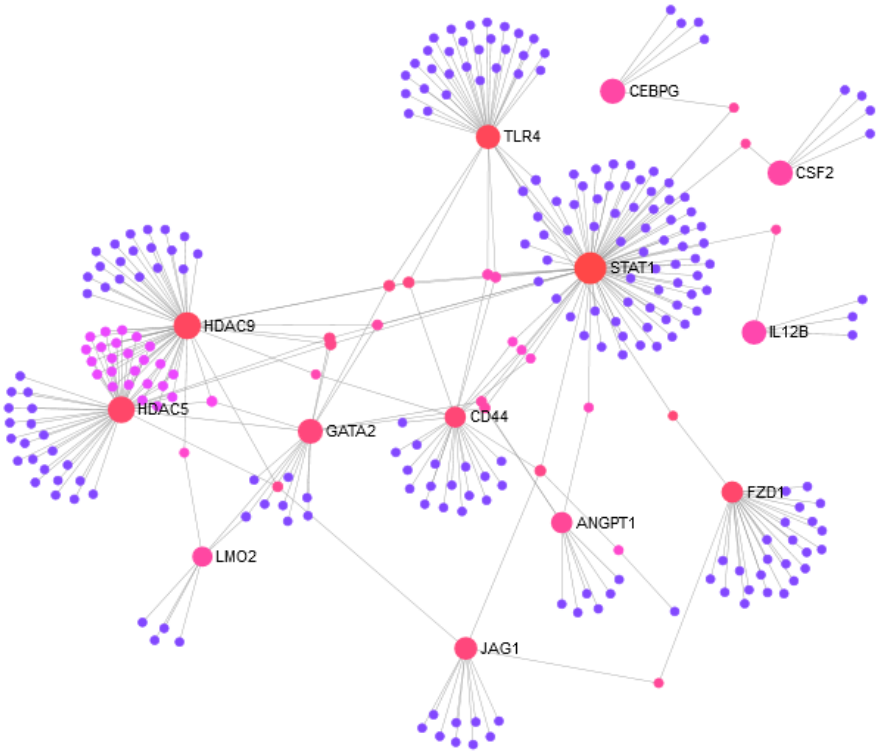
Co istotne, analiza z zastosowaniem narzędzia bioinformatycznego *NetworkAnalyst* (przeszukującego bazę danych STRING Interactom) wykazała, że geny oraz ich białkowe produkty, których ekspresja zmienia się w komórkach namnażanych w pożywce zawierającej hiPS-EVs, tworzą ze sobą sieć wzajemnych interakcji na poziomie molekularnym (Rycina 38).

Podsumowując, uzyskane dane wskazują, że zarówno krótka inkubacja komórek $CD34^+$ z hiPS-EVs, jak i ich ekspansja *ex vivo* w pożywce z dodatkiem tych pęcherzyków, wpływa na ekspresję szeregu genów związanych z kontrolą funkcji komórek hematopoetycznych, w tym m.in. ich samoodnowy, potencjału do różnicowania oraz aktywności migracyjnej.

Geny o **podwyższonej** ekspresji w **4** dniu ekspansji *ex vivo*



Geny o **obniżonej** ekspresji w **8** dniu ekspansji *ex vivo*



Rycina 38. Analiza bioinformatyczna wzajemnych interakcji pomiędzy genami, których ekspresja zmienia się w komórkach CD34⁺ poddanych ekspansji *ex vivo* w pożywce zawierającj hiPS-EVs. Po izolacji komórki hodowano w dedykowanej pożywce, zawierającej

dodatek hiPS-EVs (2 µg/ml). Kontrolę stanowiły komórki hodowane w pożywce bez pęcherzyków. W 4 oraz 8 dniu ekspansji badano poziom transkryptów dla genów związanych z procesem hematopoezy, z zastosowaniem komercyjnych zestawów Hematopoiesis RT^2 Profiler PCR Array. Graficzna analiza interakcji pomiędzy wybranymi genami w komórkach namnażanych w obecności hiPS-EVs, dla których poziom transkryptów ulega istotnej statystycznie zmianie (*p<0,05), w porównaniu do komórek kontrolnych. Analizę przeprowadzono z zastosowaniem narzędzia bioinformatycznego *NetworkAnalyst*, wykorzystującego implementację bazy danych STRING Interactom, z poziomem odcięcia (z ang. *confidence score cutoff*) równym 900. Szare linie oznaczają graficzną prezentację interakcji pomiędzy badanymi genami (przedstawionymi jako różowo-pomarańczowe kuliste symbole) o podwyższonej (krotność zmiany<1; górny panel) oraz obniżonej (krotność zmiany>1; dolny panel) ekspresji, w porównaniu do komórek kontrolnych, odpowiednio dla 4 oraz 8 dnia ekspansji. Kuliste niebieskie symbole oznaczają inne geny wchodzące w interakcje z genami badanymi, zidentyfikowane na podstawie bazy danych, przeszukiwanej przez narzędzie *NetworkAnalyst*.

4.12. Analiza wpływu hiPS-EVs na aktywność wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowania w komórkach CD34$^+$ izolowanych z KP

Otrzymane w niniejszej pracy wyniki wskazują, że efekty wpływu hiPS-EVs na komórki krwiotwórcze z KP obserwowane są już w ciągu 2 godz. od dodania tych pęcherzyków do pożywki. Sugeruje to, że oprócz zmian w ekspresji genów, regulacja funkcji tych komórek odbywać się może na drodze modulowania procesów o dużej dynamice zmian w komórce, bazujących o białka już obecne w komórce. Jedną ze ścieżek szybkiej odpowiedzi komórki na bodźce zewnętrzne jest regulacja aktywności wewnątrzkomórkowych szlaków transdukcji sygnału, odbywająca się m.in. na drodze fosforylacji lub defosforylacji białek, w tym w szczególności kinaz, zaangażowanych w te szlaki (440).

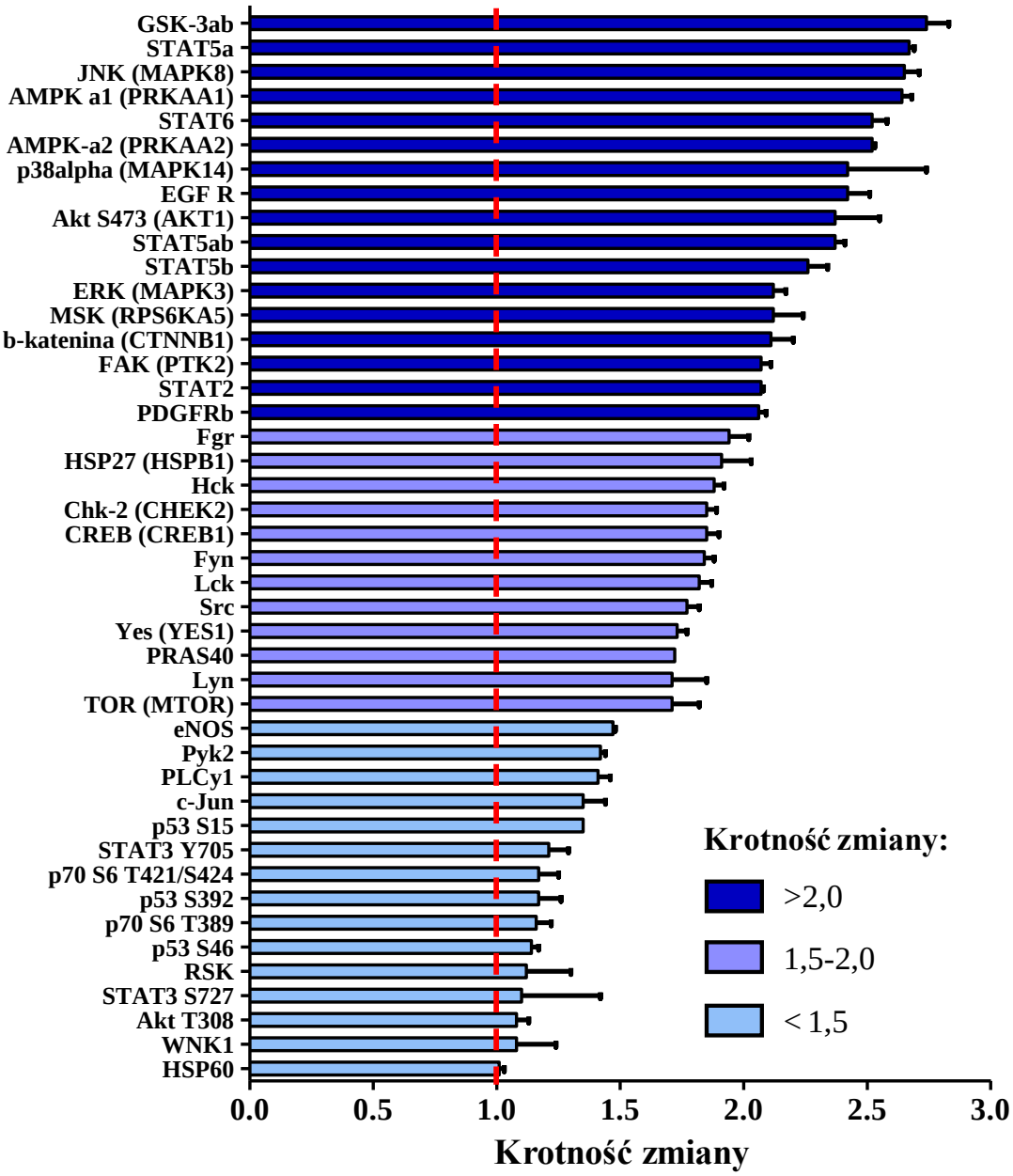
Dlatego, mając powyższe na uwadze, w następnym etapie badań przeprowadzono analizę wpływu krótkiej inkubacji komórek CD34$^+$ z hiPS-EVs na poziom ufosforylowanych form wybranych białek biorących udział w wielu znanych szlakach sygnałowania, regulujących aktywność szeregu procesów biologicznych w komórkach.

W tym celu, komórki CD34$^+$ poddawano krótkiej (2 godz.) inkubacji w pożywce z dodatkiem hiPS-EVs, a następnie przeprowadzano detekcję zmian poziomu 44 ufosforylowanych form różnych białek obecnych w tych komórkach, w porównaniu do komórek kontrolnych (inkubowanych w pożywce bez hiPS-EVs). Wykorzystano w tym celu komercyjnie dostępne zestawy macierzy Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Arrays oceniające poziom fosforylowanych form białek obecnych w lizatach komórkowych.

Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że 2-godz. inkubacja komórek CD34$^+$ z hiPS-EVs powoduje globalne zmiany w poziomie fosforylacji badanych białek (Rycina 39, Tabela 21). Szczegółowa analiza wykazała, że wśród kinaz

obecnych w komórkach $CD34^+$, największe zmiany fosforylacji po działaniu hiPS-EVs zaobserwowano dla białek z rodziny STAT, których szlak sygnałowania jest jedną z kluczowych ścieżek zaangażowanych w kontrolę pocesu hematopoezy (441, 442). W szczególności, poziom białka **STAT2** ufosforylowanego na tyrozynie (Y) 689 był 2,1 ± 0,1- krotnie wyższy w komórkach poddanych działaniu hiPS-EVs, w porównaniu do komórek kontrolnych. Z kolei poziom ufosforylowanych białek **STAT5ab** (Y694/699) oraz **STAT6** (Y641) był odpowiednio 2,4 ± 0,1- krotnie oraz 2,5 ± 0,1- krotnie wyższy w porównaniu do kontroli. Ponadto, w komórkach $CD34^+$ traktowanych hiPS-EVs, zaobserwowano 2,7 ± 0,1- krotnie wyższy poziom kinazy **GSK3-ab** ufosforylowananej na serynie (S) 21/9, w porównaniu do komórek niepoddanych inkubacji z pęcherzykami. Na podstawie literatury wiadomym jest, że w proces fosforylacji tego ostatniego zaangażowana jest kinaza Akt i taka modyfikacja skutkuje zahamowaniem aktywności GSK3-ab, prowadząc do promowania przeżycia i proliferacji komórek (443, 444). Co ważne, poziom ufosforylowanej formy samej kinazy **Akt** (na S473) był również 2,4 ± 0,2- krotnie wyższy w komórkach $CD34^+$ inkubowanych z hiPS-EVs, w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Znanym efektem ufosforylowania tej reszty aminokwasowej jest stabilizacja aktywacji Akt, wywołana działaniem białka mTORC2 (445). Dodatkowo, zaobserwowano wzrost stężenia fosforylowanej **β-kateniny**. Wiadomym jest, że ufosforylowana forma tego białka poddawana jest następnie ubikwitynacji i degradacji w proteasomach (446), co powoduje deaktywację szlaku Wnt, a tym samym może przyczyniać się m.in. do promowania różnicowania komórek krwiotwórczych (447). Nastąpił również wzrost poziomu kinazy **AMPK** ufosforylowanej na treoninie (T) 183 lub 172 (odpowiednio 2,6 ± 0,1 dla T183 i 2,5 ± 0,1 dla T172, w porównaniu do kontroli). Przegląd literatury wskazuje, że taka fosforylacja może prowadzić do aktywacji szlaków katabolicznych i oszczędzania energii w celu przeżycia komórek (448, 449).

Ponadto, kontakt komórek $CD34^+$ z hiPS-EVs prowadził również do wzrostu aktywności ścieżek zależnych od kinaz białkowych aktywowanych mitogenem (ang. *mitogen-activated protein kinase*; MAPK) w tych komórkach, poprzez fosforylację trzech kinaz MAP uczestniczących m.in w regulacji hematopoezy (450): **ERK** (2,1 ± 0,1- krotnie wyższy poziom form fosforylowanych na T202/Y204 lub T185/Y187, w porównaniu do kontroli), **JNK** (2,6 ± 0,1- krotnie wyższy poziom formy z fosforylacją na T183/Y185, T221/Y223, w porównaniu do kontroli) i **p38α** (2,4 ± 0,3- krotnie wyższy poziom formy fosforylowanej na T180/Y182, w porównaniu do kontroli). Co ważne, poziom ufosforylowanej na Y397 kinazy **FAK** był również 2,1 ± 0,1- krotnie wyższy w komórkach $CD34^+$ traktowanych hiPS-EVs, w porównaniu do poziomu w komórkach kontrolnych. Jest to kluczowe miejsce autofosforylacji tej kinazy, znane ze wzmacniania sygnalizacji od FAK, zaangażowanej m.in. w regulację adhezji, migracji i przeżycia komórek (451). Ponadto stwierdzono, że poziom białka **EGFR** fosforylowanego na Y1086 był 2,4 ± 0,9- krotnie wyższy w komórkach inkubowanych z hiPS-EVs, w porównaniu do kontroli. Wcześniejsze badania wykazały, że po ufosforylowaniu ta reszta aminokwasowa stanowi miejsce dokowania dla białka sygnałowego Grb2, wyzwalając aktywację kaskady MAPK/ERK (452).



Rycina 39. Analiza poziomu ufosforylowanych form wybranych białek uczestniczących w przekaźnictwie sygnałów w komórkach CD34⁺ z KP poddanych działaniu hiPS-EVs. Komórki CD34⁺ po 7 dniach ekspansji *ex vivo* inkubowano z hiPS-EVs przez 2 godz. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane w pożywce bez pęcherzyków. Następnie, lizaty białkowe z komórek poddawano analizie z zastosowaniem macierzy Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Arrays. Dane na wykresie przedstawiono jako średnią ± SD (N=2) krotności zmiany poziomu form białek ufosforylowanych na danych resztach aminokwasowych: T- treonina, S- seryna, Y- tyrozyna, w porównaniu do kontroli. Przerywaną linią czerwoną oznaczono poziom dla komórek kontrolnych, który przyjęto jako wartość 1. Nazwy białek podano zgodnie z danymi dostarczonymi przez producenta macierzy. W przypadku białek z kilkoma badanymi fosforylacjami, przy nazwie białka na osi x wskazano analizowaną resztę aminokwasową. Kod kolorystyczny słupków odpowiada krotności zmiany poziomu ufosforylowania: mniejszej od 1,5 (błękitny), pomiędzy 1,5 a 2 (jasno-niebieski) oraz powyżej 2 (granatowy).

Tabela 21. Zbiorcze zestawienie poziomu ufosforylowanych form wybranych białek uczestniczących w przekazie sygnałów w komórkach CD34$^+$ z KP poddanych działaniu hiPS-EVs. Komórki CD34$^+$ po 7 dniach ekspansji *ex vivo* inkubowano z hiPS-EVs przez 2 godz. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane w pożywce bez pęcherzyków. Następnie, lizaty białkowe z komórek poddawano analizie z zastosowaniem macierzy Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Arrays. Dane przedstawiono jako średnią ± SD (N=2) krotności zmiany poziomu form białek ufosforylowanych na danych resztach aminokwasowych: T- treonina, S- seryna, Y- tyrozyna, w porównaniu do kontroli. T: treonina, S-seryna, Y-tyrozyna. Nazwy białek podano zgodnie z danymi dostarczonymi przez producenta macierzy. W nawiasach wskazano alternatywną nazwę białka z bazy Uniprot, użytą podczas analizy z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych PANTHER oraz STRING. (*) Producent nie wskazuje miejsca fosforylacji.

Nazwa białka	Fosforylowana reszta aminokwasowa	Krotność zmiany poziomu formy ufosforylowanej
HSP60	- (*)	1,01 ± 0,02
WNK1	T60	1,08 ± 0,16
Akt	T308	1,08 ± 0,05
STAT3	S727	1,10 ± 0,32
RSK	S380/S386/S377	1,12 ± 0,18
p53	S46	1,14 ± 0,03
p70 S6	T389	1,16 ± 0,06
p53	S392	1,17 ± 0,09
p70 S6	T421/S424	1,17 ± 0,08
STAT3	Y705	1,21 ± 0,08
p53	S15	1,35 ± 0,00
c-Jun	S63	1,35 ± 0,09
PLCγ1	Y783	1,41 ± 0,05
Pyk2	Y402	1,42 ± 0,02
eNOS	S1177	1,47 ± 0,01
TOR (MTOR)	S2448	1,71 ± 0,11
Lyn	Y397	1,71 ± 0,14
PRAS40	T246	1,72 ± 0,00
Yes (YES1)	Y426	1,73 ± 0,04
Src	Y419	1,77 ± 0,05
Lck	Y394	1,82 ± 0,05
Fyn	Y420	1,84 ± 0,04
CREB (CREB1)	S133	1,85 ± 0,05
Chk-2 (CHEK2)	T68	1,85 ± 0,04
Hck	Y411	1,88 ± 0,04
HSP27 (HSPB1)	S78/S82	1,91 ± 0,12
Fgr	Y412	1,94 ± 0,08

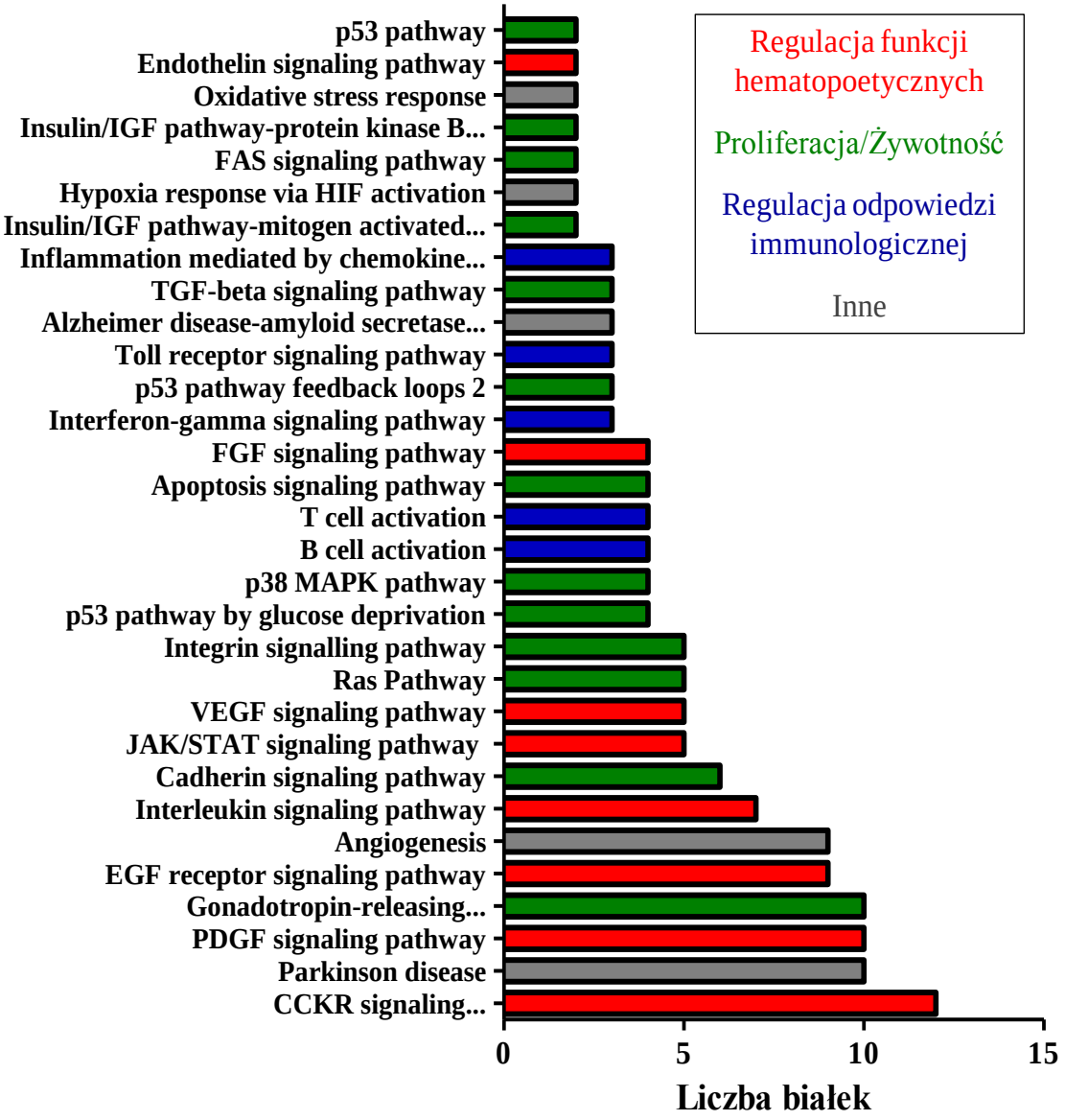
PDGFRb	Y751	2,06	±	0,03
STAT2	Y689	2,07	±	0,01
FAK (PTK2)	Y397	2,07	±	0,04
β-katenina (CTNNB1)	-	2,11	±	0,09
MSK (RPS6KA5)	S376/S360	2,12	±	0,12
ERK (MAPK3)	T202/Y204, T185/Y187	2,12	±	0,05
STAT5b	Y699	2,26	±	0,08
STAT5ab	Y694/699	2,37	±	0,04
Akt (AKT1)	S473	2,37	±	0,18
EGF R	Y1086	2,42	±	0,09
p38α (MAPK14)	T180/Y182	2,42	±	0,32
AMPK-a2 (PRKAA2)	T172	2,52	±	0,01
STAT6	Y641	2,52	±	0,06
AMPK a1 (PRKAA1)	T183	2,64	±	0,04
JNK (MAPK8)	T183/Y185, T221/Y223	2,65	±	0,06
STAT5a	Y694	2,67	±	0,02
GSK-3ab	S21/S9	2,74	±	0,09

Ponadto, analiza z wykorzystaniem narzędzia PANTHER Pathway Classification System umożliwiła klasyfikację białek o najbardziej zwiększonym poziomie ich ufosforylowanych form w komórkach poddanych działaniu hiPS-EVs (o krotności zmiany poziomu formy fosforylowanej ≥ 1,5 w porównaniu do komórek kontrolnych), do 31 odrębnych szlaków sygnałowania, zdefiniowanych jako ścieżki PANTHER (wymienianych w dalszej części tekstu w nawiasach kwadratowych, zgodnie z oryginalną nomenklaturą *PANTHER Pathways*) (Rycina 40, Tabela 22).
Część z nich można zaklasyfikować jako szlaki biorące udział w **regulacji funkcji komórek hematopoetycznych**, w tym: sygnałowanie od cholecystokininy [*CCKR signaling map*], PDGF [*PDGF signaling pathway*], od receptora dla EGF [*EGF receptor signaling pathway*] oraz interleukin [*Interleukin signaling pathway*]. Ponadto, do grupy tej zalicza się także szlaki angażujące kinazy JAK/STAT [*JAK/STAT signaling pathway*], aktywowane przez czynniki wzrostowe, w tym VEGF [*VEGF signaling pathway*] i FGF [*FGF signaling pathway*] oraz szlak związany z endoteliną [*Endothelin signaling pathway*].

Inną grupą ścieżek sygnałowych, w których uczestniczą białka o zmienionym statusie fosforylacji są **szlaki związane z kontrolą proliferacji oraz żywotności komórek**, do których zaliczyć można m.in. szlaki związane z gonadotropinami [*Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway*], sygnałowaniem kadherynowym [*Cadherin signaling pathway*], insulinowym [*Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/MAP kinase cascade* oraz *Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade*] oraz integrynowym [*Integrin signalling pathway*], a także szlaki, w których uczestniczą białka Ras [*Ras Pathway*], p53 [*p53 pathway by glucose*

deprivation, *p53 pathway feedback loops 2* oraz *p53 pathway*] oraz kinaza p38 [*p38 MAPK pathway*]. Do tej grupy należą także szlaki sygnałowe od TGF-β [*TGF-beta signaling pathway*], receptora FAS (z ang. *first apoptosis signal receptor*) [*FAS signaling pathway*], a także ogólnie definiowany przez program bioinformatyczny - szlak kontroli apoptozy [*Apoptosis signaling pathway*].

Wśród pozostałych szlaków zidentyfikowanych w analizie z zastosowaniem narzędzia bioinformatycznego *PANTHER Pathways* znajdują się także ścieżki związane z **regulacją odpowiedzi immunologicznej**, w tym: szlak aktywacji limfocytów B oraz T [*B cell activation*, *T cell activation*], sygnałowania od IFN-γ [*Interferon-gamma signaling pathway*], receptorów Toll [*Toll receptor signaling pathway*] oraz chemokin/cytokin związanych ze stanem zapalnym [*Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway*].



Rycina 40. Klasyfikacja białek, dla których poziom form fosforylowanych zmienia się w komórkach CD34$^+$ poddanych działaniu hiPS-EVs - na podstawie ich udziału

w poszczególnych szlakach sygnałowania wewnątrzkomórkowego. Komórki $CD34^+$ po 7 dniach ekspansji *ex vivo* inkubowano z hiPS-EVs przez 2 godz. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane w pożywce bez pęcherzyków. Zmiany stopnia fosforylacji reszt aminokwasowych badano z zastosowaniem macierzy Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Arrays. Otrzymane dane poddano następnie analizie z zastosowaniem narzędzia bioinformatycznego PANTHER Pathway Classification System, w trybie *PANTHER Pathway Overrepresentation Test*, który klasyfikuje białka według ich udziału w poszczególnych szlakach (tzw. *PANTHER Pathways*), definiowanych przez narzędzie PANTHER. Wykres przedstawia liczbę białek spośród analizowanej puli, które zostały zaklasyfikowane jako biorące udział w danym procesie biologicznym. W analizie uwzględniono tylko te białka, których krotność zmiany stopnia fosforylacji w komórkach po inkubacji z hiPS-EVs była ≥ 1,5 w porównaniu do poziomu w komórkach kontrolnych. Dodatkowo, w analizie PANTHER stosowany był parametr statystyczny weryfikacji pewności wyniku (z ang. *False Discovery Rate*; FDR). Zaprezentowano tylko te wyniki, dla których FDR< 0,05. Kod kolorystyczny definiuje subiektywny podział poszczególnych szlaków w zależności od ich udziału w regulacji wybranych aspektów funkcjonalnych komórek HSCs, opracowany przez Doktorantkę na podstawie przeglądu literaturowego.

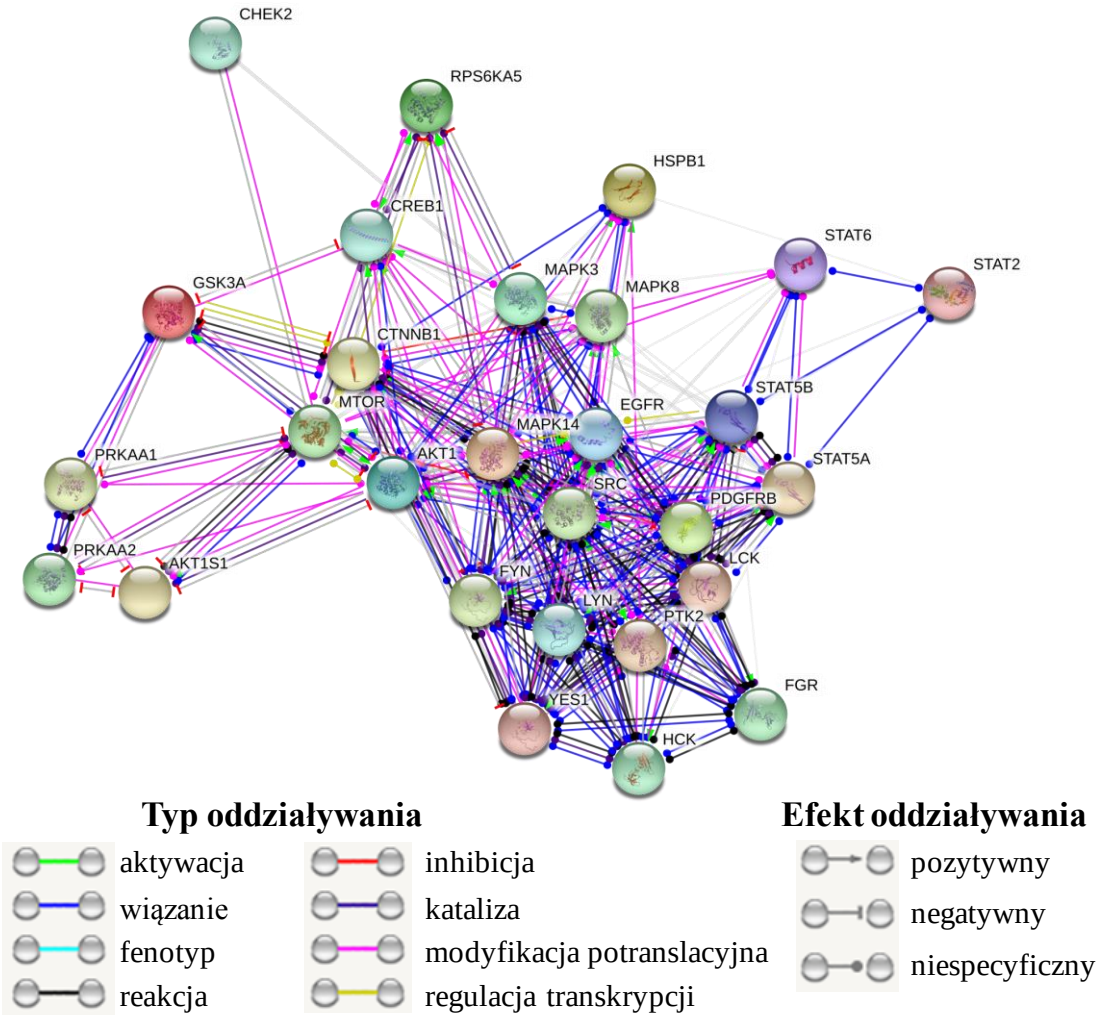
Tabela 22. Zbiorcze zestawienie białek, dla których poziom form fosforylowanych zmienia się w komórkach $CD34^+$ poddanych działaniu hiPS-EVs - na podstawie ich udziału w poszczególnych szlakach sygnałowania wewnątrzkomórkowego. Komórki $CD34^+$ po 7 dniach ekspansji *ex vivo* inkubowano z hiPS-EVs przez 2 godz. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane w pożywce bez hiPS-EVs. Zmiany stopnia fosforylacji reszt aminokwasowych badano z zastosowaniem macierzy Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Arrays. Otrzymane dane poddano następnie analizie z zastosowaniem narzędzia bioinformatycznego PANTHER Pathway Classification System, w trybie *PANTHER Pathway Overrepresentation Test*, który klasyfikuje białka według ich udziału w poszczególnych szlakach (tzw. *PANTHER Pathways*), definiowanych przez narzędzie PANTHER. Tabela przedstawia liczbę białek spośród analizowanej puli, które zostały zaklasyfikowane jako biorące udział w danym procesie biologicznym. W analizie uwzględniono tylko te białka, których krotność zmiany stopnia fosforylacji w komórkach po inkubacji z hiPS-EVs była ≥ 1,5 w porównaniu do poziomu w komórkach kontrolnych. Dodatkowo, w analizie PANTHER stosowane było kryterium weryfikacji pewności wyniku, tzw. *False Discovery Rate* (FDR). Zaprezentowano tylko te wyniki, dla których FDR<0,05. Parametry statystyczne: FDR oraz parametr P zostały wygenerowane przez narzędzie PANTHER, na podstawie typu testu statystycznego Fisher'a z wielokrotną korekcją (ang. *Fisher's Exact with FDR multiple test correction*).

Szlaki sygnałowe zidentyfikowane przez narzędzie PANTHER (PANTHER Pathways) *	Liczba białek	Parametr P	Parametr FDR
CCKR signaling map	12	$4{,}21 \cdot 10^{-18}$	$3{,}43 \cdot 10^{-16}$
Parkinson disease	10	$1{,}59 \cdot 10^{-16}$	$8{,}62 \cdot 10^{-15}$
PDGF signaling pathway	10	$5{,}60 \cdot 10^{-15}$	$2{,}28 \cdot 10^{-13}$
Gonadotropin-releasing hormone receptor pathway	10	$4{,}45 \cdot 10^{-13}$	$1{,}21 \cdot 10^{-11}$
EGF receptor signaling pathway	9	$2{,}13 \cdot 10^{-13}$	$6{,}96 \cdot 10^{-12}$

Angiogenesis	9	$1{,}32 \cdot 10^{-12}$	$3{,}06 \cdot 10^{-11}$
Interleukin signaling pathway	7	$3{,}57 \cdot 10^{-11}$	$7{,}28 \cdot 10^{-10}$
Cadherin signaling pathway	6	$6{,}63 \cdot 10^{-08}$	$8{,}32 \cdot 10^{-07}$
JAK/STAT signaling pathway	5	$7{,}37 \cdot 10^{-11}$	$1{,}33 \cdot 10^{-09}$
VEGF signaling pathway	5	$4{,}01 \cdot 10^{-08}$	$6{,}54 \cdot 10^{-07}$
Ras Pathway	5	$5{,}99 \cdot 10^{-08}$	$8{,}13 \cdot 10^{-07}$
Integrin signalling pathway	5	$5{,}33 \cdot 10^{-06}$	$5{,}43 \cdot 10^{-05}$
p53 pathway by glucose deprivation	4	$4{,}29 \cdot 10^{-08}$	$6{,}35 \cdot 10^{-07}$
p38 MAPK pathway	4	$3{,}92 \cdot 10^{-07}$	$4{,}56 \cdot 10^{-06}$
B cell activation	4	$2{,}55 \cdot 10^{-06}$	$2{,}77 \cdot 10^{-05}$
T cell activation	4	$7{,}31 \cdot 10^{-06}$	$7{,}01 \cdot 10^{-05}$
Apoptosis signaling pathway	4	$2{,}10 \cdot 10^{-05}$	$1{,}80 \cdot 10^{-04}$
FGF signaling pathway	4	$2{,}30 \cdot 10^{-05}$	$1{,}88 \cdot 10^{-04}$
Interferon-gamma signaling pathway	3	$1{,}02 \cdot 10^{-05}$	$9{,}20 \cdot 10^{-05}$
p53 pathway feedback loops 2	3	$4{,}98 \cdot 10^{-05}$	$3{,}87 \cdot 10^{-04}$
Toll receptor signaling pathway	3	$7{,}54 \cdot 10^{-05}$	$5{,}59 \cdot 10^{-04}$
Alzheimer disease-amyloid secretase pathway	3	$1{,}18 \cdot 10^{-04}$	$8{,}35 \cdot 10^{-04}$
TGF-beta signaling pathway	3	$3{,}12 \cdot 10^{-04}$	$2{,}12 \cdot 10^{-03}$
Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	3	$4{,}74 \cdot 10^{-03}$	$2{,}58 \cdot 10^{-02}$
Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/MAP kinase cascade	2	$9{,}86 \cdot 10^{-04}$	$6{,}43 \cdot 10^{-03}$
Hypoxia response via HIF activation	2	$9{,}86 \cdot 10^{-04}$	$6{,}18 \cdot 10^{-03}$
FAS signaling pathway	2	$1{,}04 \cdot 10^{-03}$	$6{,}30 \cdot 10^{-03}$
Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade	2	$1{,}49 \cdot 10^{-03}$	$8{,}66 \cdot 10^{-03}$
Oxidative stress response	2	$2{,}87 \cdot 10^{-03}$	$1{,}62 \cdot 10^{-02}$
Endothelin signaling pathway	2	$5{,}94 \cdot 10^{-03}$	$3{,}12 \cdot 10^{-02}$
p53 pathway	2	$6{,}48 \cdot 10^{-03}$	$3{,}30 \cdot 10^{-02}$

(*) W tabeli uwzględniono oryginalne terminy określające szlaki sygnałowe identyfikowane przez narzędzie PANTHER (terminologia anglojęzyczna).

Wszystkie białka zidentfikowane i analizowane za pomocą narzędzia *PANTHER* zostały również zgrupowane w bazie STRING (z ang. *Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*), a zyskane rezultaty świadczą o wyraźnej sieci powiązań i wzajemnego oddziaływania pomiędzy tymi białkami (Rycina 41).



Rycina 41. Analiza interakcji między białkami, dla których stopień fosforylacji zmienia się w komórkach CD34⁺ poddanych działaniu hiPS-EVs. Komórki CD34⁺ po 7 dniach ekspansji *ex vivo* inkubowano z hiPS-EVs przez 2 godz. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane w pożywce bez hiPS-EVs. Zmiany stopnia fosforylacji reszt aminokwasowych badano z zastosowaniem macierzy Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Arrays. Otrzymane dane poddano następnie analizie z zastosowaniem narzędzia bioinformatycznego STRING, w trybie analizy *Molecular action*, który określa rodzaj oddziaływania pomiędzy białkami. W analizie uwzględniono tylko te białka, których krotność zmiany stopnia fosforylacji w komórkach po inkubacji z hiPS-EVs była ≥ 1,5 w porównaniu do poziomu w komórkach kontrolnych. Kod kolorystyczny linii pomiędzy poszczególnymi białkami, przedstawionymi jako kuliste symbole, odpowiada rodzajowi oddziaływania między danymi białkami, zgodnie z zamieszczoną legendą. Nazwy białek prezentowane przez grafikę pochodzą z bazy danych Uniprot (https://www.uniprot.org).

Podsumowując, poddanie komórek CD34⁺ z KP działaniu hiPS-EVs wpływa na aktywację szeregu wewnątrzkomórkowych szlaków przekazu sygnału w tych komórkach, w tym w szczególności szlaków biorących udział w regulacji funkcji komórek krwiotwórczych.

4.13. Ocena wpływu hiPS-EVs na zasiedlanie nisz szpikowych i rekonstytucję układu krwiotwórczego przez komórki CD34$^+$ z KP *in vivo*

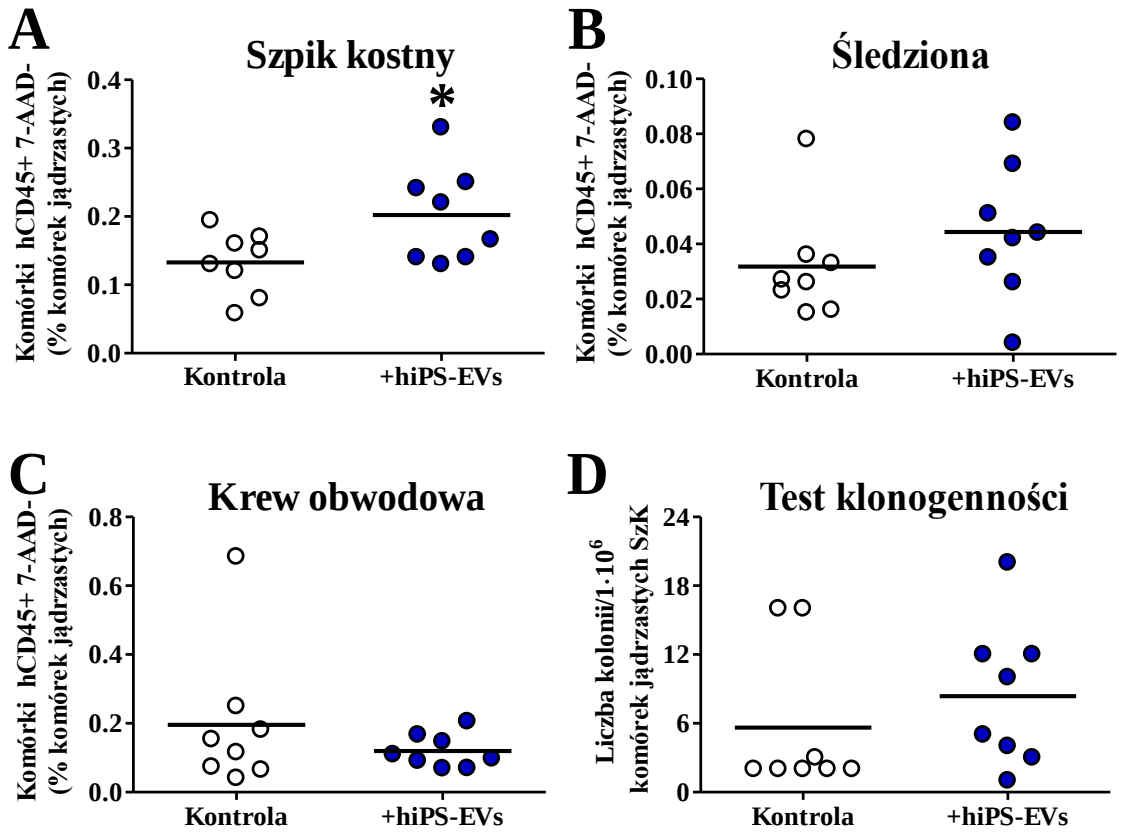
W oparciu o otrzymane wyniki badań *in vitro* opisane powyżej, świadczące o wpływie hiPS-EVs na wybrane właściwości biologiczne komórek CD34$^+$ z KP, które mogą być istotne z punktu widzenia ich potencjału hematopoetycznego, w tym m.in. na ich klonogenność, aktywność chemotaktyczną oraz zdolność do interakcji ze składnikami niszy szpikowej, w następnym etapie podjęto się zbadania, czy efekt ten będzie miał przełożenie na funkcje tych komórek *in vivo*. Dlatego też, przeprowadzono eksperyment polegający na przeszczepie namnożonych *ex vivo* komórek CD34$^+$, poddanych uprzedniej 2- godzinnej inkubacji w pożywce zawierającej hiPS-EVs, do zwierząt, u których wykonano subletalną mieloablację z zastosowaniem promieniowania γ. W skrócie, komórki inkubowane z pęcherzykami oraz komórki kontrolne (tj. inkubowane w pożywce bez iPS-EVs) przeszczepiano do szczepu myszy NOD/SCID, które dobę przed podaniem komórek poddawane były naświetleniu promieniowaniem γ, w celu uszkodzenia ich układu krwiotwórczego. Następnie, w określonych punktach czasowych po przeszczepie, analizowano SzK, krew obwodową oraz komórki pobrane ze śledziony myszy - pod kątem obecności w tym materiale tkankowym ludzkich komórek hematopoetycznych, identyfikowanych na podstawie ekspresji ludzkiego antygenu CD45 (tj. komórek hCD45$^+$). Zastosowano detekcję tych komórek (stanowiących komórki potomne powstałe na skutek podziałów wszczepionych komórek HSCs) na podstawie obecności markera CD45, ponieważ jest on obecny na wszystkich komórkach krwi (z wyjątkim erytrocytów), bez względu na stopień ich zróżnicowania (44). Takie podejście umożliwiało wykrycie w badanym materiale zarówno komórek krwiotwórczych, jak i ich bardziej zróżnicowanych komórek potomnych.

W pierwszej kolejności analizowano tkanki myszy, pobierane 48 godz. od przeszczepu, w celu zbadania efektywności zasiedlania nisz hematopoetycznych (z ang. *homing*) przez przeszczepione komórki CD34$^+$.
Otrzymane wyniki świadczą o istotnie statystycznie większej liczbie żywych komórek hCD45$^+$ obecnych w SzK myszy, którym przeszczepiano ludzkie komórki CD34$^+$ stymulowane hiPS-EVs, w porównaniu do komórek kontrolnych (0,20 ± 0,07 vs. 0,13 ± 0,05% komórek jądrzastych; Rycina 42A). Podobnie, liczba ludzkich komórek była również nieznacznie wyższa w śledzionach myszy z przeszczepionymi komórkami CD34$^+$, uprzednio traktowanymi hiPS-EVs, w porównaniu do komórek kontrolnych (0,04 ± 0,02 vs. 0,03 ± 0,02 % komórek jądrzastych; $p>0,05$; Rycina 42B).

Z drugiej jednak strony, zaobserwowano, że liczba komórek hCD45$^+$ krążących w krwi obwodowej myszy była niższa dla komórek poddanych uprzedniej inkubacji z hiPS-EVs, w porównaniu do komórek kontrolnych (0,12 ± 0,05 vs. 0,20 ± 0,21 % komórek jądrzastych; $p>0,05$; Rycina 42C). Sugeruje to, że hiPS-EVs mogą zwiększać migrację przeszczepionych komórek z naczyń krwionośnych (jako miejsca podania) do

SzK oraz śledziony, co promuje zasiedlanie przez nie wspomnianych nisz hematopoetycznych.

Ponadto, gdy komórki jądrzaste SzK myszy wysiewano do pożywki z metylocelulozą zawierającą ludzkie czynniki wzrostu (test CFC), liczba otrzymanych kolonii hematopoetycznych była wyższa w przypadku szpiku od myszy z przeszczepionymi komórkami $CD34^+$ traktowanymi hiPS-EVs, w porównaniu do szpiku, który pozyskiwano od zwierząt po przeszczepieniu komórek $CD34^+$ nietraktowanych pęcherzykami (odpowiednio 8,4 ± 6,3 vs. 5,6 ± 6,4 kolonii/10^6 komórek jądrzastych SzK; $p>0,05$; Rycina 42D). Może to potwierdzać opisane powyżej wyniki analizy cytometrycznej, świadczące o tym, że pre-kondycjonowanie komórek $CD34^+$ za pomocą hiPS-EVs zwiększa ich zdolność do zasiedlania niszy szpikowej po przeszczepie.



Rycina 42. Ocena wpływu hiPS-EVs na zasiedlanie nisz (ang. *homing*) przez komórki $CD34^+$ z KP *in vivo*. Komórki $CD34^+$ po 7 dniach ekspansji *ex vivo* poddawano inkubacji z hiPS-EVs przez 2 godz. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane w pożywce bez hiPS-EVs. Następnie, komórki przeszczepiano do splotu oczodołowego ($2 \cdot 10^5$ komórek/mysz) myszom szczepu NOD/SCID, naświetlonym promieniowaniem γ (2 x 100 cGy) 24 godz. przed podaniem komórek. Po 48 godz. po przeszczepie pobierano szpik, śledzionę oraz krew obwodową myszy, barwiono przeciwciałami anty-hCD45 oraz barwnikiem jądrowym 7-aminoaktynomycyną D (7-AAD), a następnie analizowano obecność żywych ludzkich komórek krwi ($hCD45^+7\text{-}AAD^-$) w pobranym materiale za pomocą cytometru przepływowego BD

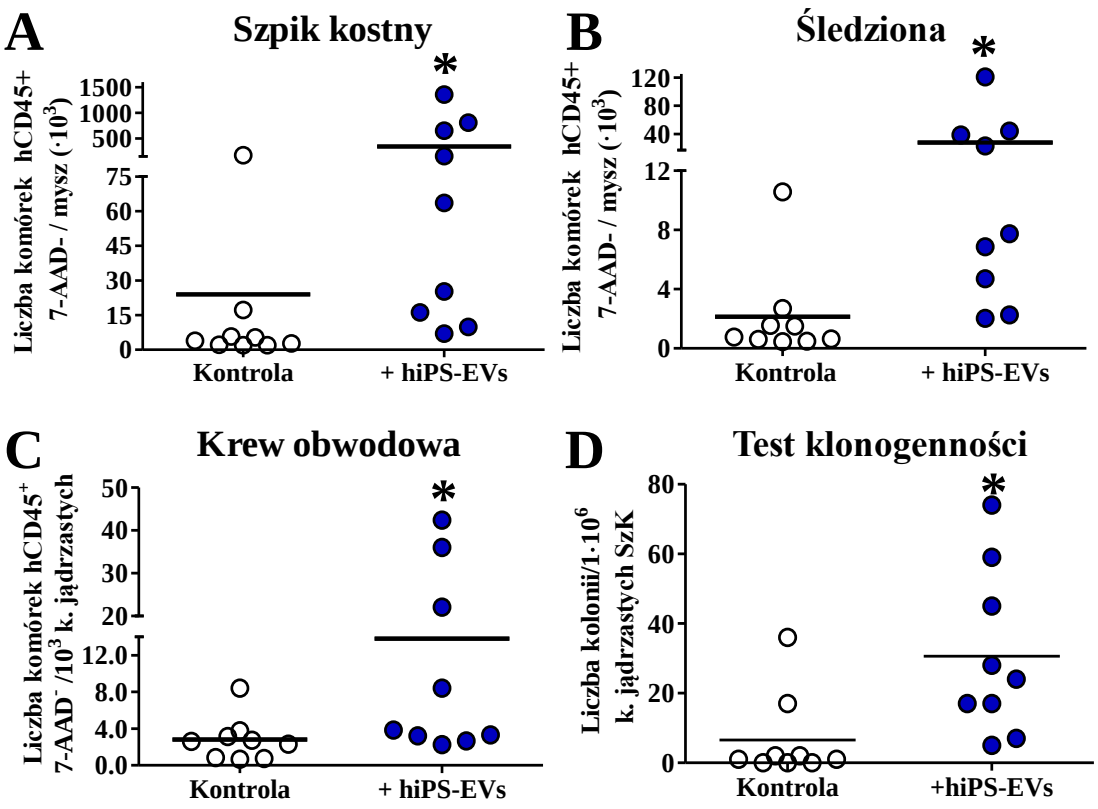
LSRFortessa. Część komórek SzK myszy wysiewano również w metylocelulozie celem oceny potencjału klonogennego. Wykresy przedstawiające odsetek komórek $hCD45^+7\text{-}AAD^-$ w puli komórek jądrzastych ze szpiku (**A**), śledziony (**B**) oraz krwi obwodowej myszy (**C**), którym podano komórki kontrolne oraz komórki poddane działaniu hiPS-EVs. Każdy z punktów na wykresie odpowiada pomiarowi dla jednego zwierzęcia (N=8/grupę). Czarna pozioma linia wskazuje wartość średnią. *$p<0,05$ względem kontrolnych komórek $CD34^+$. **D**: Liczba ludzkich kolonii hematopoetycznych, uzyskanych po wysianiu 1 mln komórek jądrzastych SzK myszy do pożywki Human Methylcellulose Enriched Media. Każdy z punktów na wykresie odpowiada pomiarowi dla SzK pobranego od jednego zwierzęcia (N=8/grupę). Czarna pozioma linia wskazuje wartość średnią.

W kolejnnym etapie eksperymentu *in vivo* tkanki myszy pobierano dopiero po 8 tygodniach od przeszczepu, w celu zbadania efektywności wszczepienia (z ang. *engraftment*) i chimeryzmu po podaniu komórek $CD34^+$ z KP poddanych działaniu hiPS-EVs, w porównaniu do komórek kontrolnych.

Otrzymane wyniki wskazują, że inkubacja komórek $CD34^+$ z hiPS-EVs przed przeszczepem istotnie zwiększa ich wbudowywanie się w niszy SzK myszy NOD/SCID poddanych radiacyjnej mieloablacji (Rycina 43A). W szczególności, średnia liczba szpikowych żywych komórek $hCD45^+$ - przypadająca w przeliczeniu na komórki jądrzaste szpiku izolowane z jednej myszy - była ok. 14,5-krotnie wyższa u myszy, którym podawano komórki $CD34^+$ traktowane pęcherzykami ($344,8 \pm 485,7 \cdot 10^3$ komórek $hCD45^+$/mysz), w porównaniu do komórek kontrolnych – tj. komórek $CD34^+$ nieinkubowanych z hiPS-EVs ($24,0 \pm 56,8 \cdot 10^3$ komórek $hCD45^+$/mysz).
Podobne rezultaty otrzymano także w przypadku analizy obecności ludzkich komórek z ekspresją antygenu CD45 w śledzionie, gdzie liczba tych komórek była ok. 13-krotnie wyższa dla komórek poddanych działaniu hiPS-EVs ($27,8 \pm 38,4 \cdot 10^3$ komórek $hCD45^+$/mysz), w porównaniu do komórek kontrolnych ($2,1 \pm 3,2 \cdot 10^3$ komórek $hCD45^+$/mysz; Rycina 43B).

Co istotne, analogiczną tendencję zaobserwowano również w przypadku komórek $hCD45^+$ krążących w krwi obwodowej, przy czym wzrost ten był ok. 5-krotny w przypadku krwi od zwierząt, którym przszczepiono komórki $CD34^+$ inkubowane z pęcherzykami ($13,8 \pm 14,9$ komórek $hCD45^+/10^3$ komórek jądrzastych krwi), w porównaniu do zwierząt, którym podano komórki kontrolne ($2,8 \pm 2,3$ komórek $hCD45^+/10^3$ komórek jądrzastych krwi; Rycina 43C).

Ponadto, w teście oceniającym klonogenność HSCs w pożywce z metylocelulozą wykazano, że liczba ludzkich kolonii hematopoetycznych, które powstały po wysianiu 1 miliona komórek jądrzastych SzK była również wyższa dla grupy myszy, którym podano komórki $CD34^+$ poddane działaniu hiPS-EVs, w porównaniu do komórek nieinkubowanych z pęcherzykami (odpowiednio $30,7 \pm 23,8$ vs. $6,6 \pm 12,3$ kolonii/10^6 komórek jądrzastych SzK; Rycina 43D).



Rycina 43. Ocena wpływu hiPS-EVs na wszczepienie (ang. *engraftment*) komórek CD34$^+$ z KP po przeszczepie *in vivo*. Komórki CD34$^+$ po 7 dniach ekspansji *ex vivo* poddawano inkubacji z hiPS-EVs przez 2 godz. Kontrolę stanowiły komórki inkubowane w pożywce bez hiPS-EVs. Następnie, komórki przeszczepiano do splotu oczodołowego ($2 \cdot 10^5$ komórek/mysz) myszom szczepu NOD/SCID, naświetlonym promieniowaniem γ (2 x 100 cGy) 24 godz. przed podaniem komórek. Po 8 tygodniach po przeszczepie pobierano szpik, śledzionę oraz krew obwodową myszy, barwiono przeciwciałami anty-hCD45 oraz barwnikiem jądrowym 7-AAD, a następnie analizowano obecność żywych ludzkich komórek hCD45$^+$7-AAD$^-$ w pobranym materiale za pomocą cytometru przepływowego BD LSRFortessa. Część komórek SzK myszy wysiewano również do testu CFC oceniającego klonogenność. Wykresy przedstawiające liczbę komórek hCD45$^+$7-AAD$^-$ w puli komórek jądrzastych ze szpiku (**A**) i śledziony (**B**) w przeliczeniu na mysz. **C**: Wykres przedstawiające liczbę komórek hCD45$^+$7-AAD$^-$ w krwi obwodowej myszy, w przeliczeniu na 10^3 komórek jądrzastych. **D**: Liczba ludzkich kolonii hematopoetycznych, uzyskanych po wysianiu 1 mln komórek jądrzastych SzK myszy do pożywki Human Methylcellulose Enriched Media. Każdy z punktów na wykresach odpowiada pomiarowi dla jednego zwierzęcia (N=9/grupę). Czarna pozioma linia wskazuje wartość średnią. *p<0,05 względem kontrolnych komórek CD34$^+$.

Podsumowując, analiza wyników uzyskanych w eksperymencie *in vivo* z zastosowaniem myszy szczepu NOD/SCID wykazała, że hiPS-EVs zwiekszają efektywność zasiedlania nisz komórek krwiotwórczych oraz rekonstytucji układu hematopoetycznego przez komórki CD34$^+$ izolowane z KP.

5. DYSKUSJA

Przeszczep materiału klinicznego zawierającego komórki krwiotwórcze, w tym przeszczep m.in. szpiku kostnego i mobilizowanej krwi obwodowej, jest często niezbędnym etapem procedur leczenia różnych typów zaburzeń hematologicznych, które rokrocznie stanowią realne zagrożenie dla życia tysięcy pacjentów na całym świecie. Istotnym czynnikiem limitującym powodzenie terapii jest znalezienie dawcy allogenicznego tych komórek, wykazującego odpowiedni poziom zgodności z biorcą w obrębie antygenów HLA. W konsekwencji, w przypadku części pacjentów utrudnione jest znalezienie na czas odpowiedniego dawcy materiału do przeszczepu ratującego im życie. Z tego względu, poszukiwanie dodatkowych źródeł komórek krwiotwórczych do zastosowania klinicznego jest aktualnym problemem współczesnych nauk biomedycznych (453).

Postęp zarówno w naukach podstawowych, jak i translacyjnych, dokonany od czasów pierwszych prac mówiących o obecności komórek krwiotwórczych w krwi pępowinowej sprawił, że w ostatnich latach wykorzystanie tego materiału biologicznego okazało się atrakcyjną alternatywą dla przeszczepów szpiku, w przebiegu leczenia w szczególności chorób hematologicznych oraz nowotworowych (454). Jednakże, limitowana liczba komórek krwiotwórczych obecnych w pojedynczej jednostce KP stwarza obecnie istotne ograniczenie dla jej efektywnego wykorzystania u dorosłych pacjentów (168, 215). Dlatego też, opracowanie efektywnych protokołów namnażania HSCs izolowanych z KP w warunkach *ex vivo* stało się istotnym wyzwaniem współczesnej medycyny transplantacyjnej, w szczególności hematologii, a ich opracowanie umożliwiłoby bardziej efektywne wykorzystanie tego materiału, w tym także już zbankowanych jednostek KP, których utylizacja i utrata budzi wątpliwości nie tylko natury merytorycznej i finansowej, ale także etycznej (213, 455). Pomimo wielu prób efektywnego namnażania komórek HSCs *ex vivo*, uzyskiwane rezultaty są wciąż niezadowalające.

Dlatego, **oprócz prac nad protokołami ekspansji, poszukuje się także nowych strategii stymulacji HSCs *ex vivo*, zwiększających ich potencjał do wszczepiania oraz podjęcia funkcji krwiotwórczych po przeszczepie, co mogłoby zrekompensować ich niską liczbę** (456). Kluczem do sukcesu w tym względzie wydaje się opracowanie optymalnych pożywek namnażających z dodatkiem szeregu czynników wzrostowych, modulujących nie tylko proliferację komórek HSCs, ale także ich szeroko pojęty potencjał hematopoetyczny, czyli szereg funkcji biologicznych prowadzących do efektywnego zasiadlania nisz krwiotwórczych, wszczepiania oraz podejmowania przez te komórki różnicowania w kierunku poszczególnych linii komórek hematopoetycznych (213, 254, 457). Jednakże, pomimo szeregu tego typu pożywek, które już zostały opracowane i są dostępne na rynku, wciąż nie udało się osiągnąć optymalnych warunków ekspansji HSCs, przy równoczesnym utrzymaniu ich wysokiego potencjału krwiotwórczego i niezróżnicowanego charakteru. W związku z powyższym, trwają intensywne badania prowadzone przez wiele grup badawczych

nad nowatorskimi strategiami zwiększania efektywności terapeutycznej KP w praktyce klinicznej, co również przyświecało badaniom opisanym w niniejszej rozprawie.

Na drodze do znalezienia optymalnych warunków namnażania *ex vivo* oraz „pre-kondycjonowania" komórek krwiotwórczych w celu zwiększenia ich potencjału hematopoetycznego, kluczową rolę odgrywa poszukiwanie cząsteczek o aktywności parakrynnej, zdolnych do aktywacji zmian cech morfologicznych oraz funkcjonalnych w komórkach.

Obecnie, wiadomym jest, że oprócz znanych od wielu lat klas takich bioaktywnych związków, do których zalicza się m.in. rozpuszczalne czynniki wzrostu, cytokiny czy chemokiny, istnieje także grupa czynników przenoszonych pomiędzy komórkami w formie zamkniętej - w obłonionych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (458). Dlatego też, osiągnięcia ostatnich lat stały się podstawą do rosnącego zainteresowania zastosowaniem EVs w medycynie regeneracyjnej, w tym także w hematologii, w kontekście możliwości poszerzenia wykorzystania KP jako materiału przeszczepowego (459, 460).

Początkowo, prace naukowców koncentrowały się na ocenie wpływu EVs wydzielanych przez komórki będące naturalnymi komponentami hematopoetycznej niszy szpikowej, na właściwości biologiczne komórek HSCs. Przykładowo, kilka grup badawczych opublikowało dane wskazujące, że EVs ze szpikowych komórek MSCs mogą wpływać na komórki krwiotwórcze obecne w KP, zwiększając ich skuteczność terapeutyczną (429, 461). Podobnie, wykazano, że EVs wydzielane przez linię osteoblastyczną zdolne są do zwiększenia efektywności ekspansji *ex vivo* komórek $CD34^+$ wyizolowanych z KP (462).

Jednakże, **wciąż niewiele wiadomo na temat wpływu na komórki HSCs pęcherzyków wydzielanych przez inne, niezwiązane bezpośrednio z niszą szpikową oraz bardziej wczesne rozwojowo populacje komórek**. Jednymi z początkowych badań poruszających ten apsekt były badania grupy prof. Ratajczaka, które wykazały, że EVs uwalniane przez mysie zarodkowe komórki macierzyste mogą stymulować ekspansję mysich hematopoetycznych komórek progenitorowych szpiku kostnego i zwiększać ich żywotność (428). Dodatkowo, ostatnie badania naszego zespołu wykazały, że EVs wydzielane przez ludzkie komórki iPS - ze względu na swoją unikatową, aktywną biologicznie zawartość - wykazują działanie cytoprotekcyjne na komórki sercowe, zwiększając jednocześnie ich zdolność do proliferacji oraz różnicowania (396).

Stąd też, **interesującym aspektem badawczym było dla nas zweryfikowanie hipotezy, że pęcherzyki pochodzące z komórek pluripotencjalnych będą również zdolne modulować funkcje komórek krwiotwórczych izolowanych z KP i zagadnienie to stało się podstawą niniejszej rozprawy doktorskiej.**

W pracy wykorzystano hiPS-EVs, których charakterystykę składu biologicznego (w tym zawartości szeregu miRNA i białek) zamieszczono w uprzednio opublikowanej pracy naszego zespołu (396). Warto zaznaczyć, że praca ta była jedną z pierwszych na

świecie dotyczących analizy ilościowej oraz jakościowej składu pęcherzyków wydzielanych przez ludzkie komórki iPS oraz ich aktywności biologicznej w wybranych, dojrzałych komórkach docelowych.

Postęp wiedzy w obszarze badań nad EVs, dostępność nowych metod badawczych, a w konsekwencji kształtowanie się opracowanych przez towarzystwo naukowe ISEV wytycznych dotyczących badań nad EVs (416) sprawiły, że na potrzeby niniejszej pracy rozbudowano i uzupełniono uprzednią charakterystykę zawartości hiPS-EVs o ich cechy morfologiczne oraz profil antygenowy. Analiza ta miała także na celu jednoznaczną weryfikację jakości materiału obecnego w próbkach hiPS-EVs stosowanych bezpośrednio w eksperymentach na komórkach $CD34^+$, których wyniki weszły w skład niniejszej rozprawy doktorskiej.

hiPS-EVs izolowano z pożywki hodowlanej znad linii komórek hiPS, które uprzednio wyprowadzono w naszym laboratorium, a następnie propagowano w warunkach bezsurowiczych, bez obecności substancji odzwierzęcych oraz warstwy komórek podścieliskowych (z ang. *serum-free, xeno-free, feeder-free conditions*). W kontekście późniejszych badań, zastosowanie takiej metody hodowli komórek niosło ze sobą szereg korzyści, w porównaniu do tradycyjnych systemów. Surowica stosowana jako suplement standardowych pożywek hodowlanych jest źródłem szeregu czynników parakrynnych, w tym może także zawierać EVs, które mogłyby ulegać ko-izolacji wraz z pęcherzykami wydzielanymi przez hodowane komórki hiPS (328, 463). Tym samym, czynniki te mogłyby stanowić istotne zanieczyszczenie próbek, maskujące efekty biologiczne pochodzące od EVs wydzielanych przez komórki hiPS. Podobne ryzyko istniałoby również przy hodowli komórek hiPS na warstwie komórek odżywczych, które także stosuje się w protokołach ekspansji tych KM (464). Ponadto, zastosowanie zdefiniowanych pożywek hodowlanych, niezawierającyh substancji odzwierzęcych w stosowanych płynach hodowlanych ułatwia również potencjalne przeniesienie wyników badań podstawowych do praktyki klinicznej, stawiającej wysokie wymagania warunkom hodowli ludzkich komórek do celów medycznych w tzw. standardzie GMP (z ang. *good manufacturing practice*) (465).
Mając na uwadze powyższe, również w przypadku hodowli komórek $CD34^+$ z KP wykorzystano komercyjną pożywkę bezsurowiczą. Przy jej wyborze kierowano się także m.in. opublikowanymi wynikami badań przedklinicznych, gdzie w eksperymentach porównawczych pożywka ta wykazywała wysoką efektywność namnażania wczesnych subpopulacji komórek krwiotwórczych z KP w hodowli *ex vivo* (456). Co istotne, pożywka ta została uzupełniona dedykowanym jej suplementem, zawierającym trzy kluczowe czynniki wzrostowe dla komórek HSCs: SCF, FLT3L oraz trombopoetynę. Zgodnie z informacją zamieszczoną na stronie producenta, dodatek tak opracowanego suplementu umożliwia efektywną ekspansję komórek $CD34^+$, ze szczególnym uwzględnieniem najwcześnieszych rozwojowo subpopulacji oraz wczesnych progenitorów, bez promowania ich dalszego różnicowania. Zatem pożywka ta teoretycznie zapewnia namnożenie tych komórek z zachowaniem ich potencjału macierzystości, co jednak nie zostało w pełni potwierdzone w niniejszej pracy.

hiPS-EVs otrzymywano z pożywki hodowlanej znad linii komórek hiPS, poprzez jej sekwencyjne wirowanie z etapem ultrawirowania. Pomimo rozwoju technik izolacji pęcherzyków, metoda ultrawirowania wciąż uważana jest za złoty standard, a jej zastosowanie nie wiąże się z koniecznością stosowania reagentów, które mogłyby wpływać na właściwości otrzymywanych EVs (326). Ponadto, umożliwia ona otrzymanie heterogennej mieszaniny mniejszych (egzosomy) oraz większych (ektosomy) pęcherzyków, odzwierciedlającej różnorodność wydzielniczą komórek rodzicielskich, bez eliminacji części EVs mogących również wykazywać aktywność biologiczną, co może mieć miejsce w przypadku innych metod izolacji.

Istotnie, przeprowadzona przeze mnie analiza próbek hiPS-EVs z zastosowaniem metody NTA potwierdziła obecność nanocząstek o zróżnicowanej średnicy hydrodynamicznej. Pomimo otrzymanej wartości średniej wielkości cząstek wynoszącej 215,73 ± 7,18 nm, wartość modalna, a zatem wartość o największym prawdopodobieństwie wystąpienia w badanej populacji nanocząstek, była wyraźnie przesunięta w stronę mniejszych obiektów, tj. wynosiła 152,57 ± 20,44 nm, co może świadczyć o wzbogaceniu próbki w mniejsze pęcherzyki, pomimo wyższej wartości średniej uzyskanej z pomiaru. Ponadto, histogram rozkładu wielkościowego wykazał obecność głównego piku przy wartości średnicy hydrodynamicznej wynoszącej 134 nm, co również potwierdza obecność frakcji małych pęcherzyków. Dodatkowo, mając na uwadze fakt, że średnica hydrodynamiczna otrzymywana z pomiarów NTA jest większa niż średnica samej cząstki poddawanej pomiarowi (466), a także uwzględniając morfologię obiektów uzyskaną dzięki mikroskopii sił atomowych, można wysnuć wniosek, że **badane próbki hiPS-EVs faktycznie zawierają struktury pęcherzykowe o submikronowej wielkości, odpowiadającej kryteriom definicji EVs opracowanej przez ISEV** (416), co potwierdza, że zastosowany w tej pracy protokół izolacji EVs metodą ultrawirowania umożliwia efektywną izolację pęcherzyków z pożywki kondycjonowanej.

Z uwagi na fakt, iż wytyczne ISEV obejmują także charakterystykę składu biologicznego EVs, w następnym kroku przeprowadzono analizę jakościową zawartości biochemicznej hiPS-EVs, z uwzględnieniem obecności białkowych markerów powierzchniowych oraz cytoplazmatycznych. Wykorzystano w tym celu m.in. cytomer Apogee A50-Micro, będący unikatowym urządzeniem, dedykowanym do analizy nanocząstek o rozmiarach rzędu kilkuset nanometrów. Co istotne, posiada on czułość detekcji oraz rozdzielczość przewyższające te dostępne w przypadku klasycznych cytometrów, służących głównie do badań na komórkach (467).

Zastosowanie wysokorozdzielczej cytometrii przepływowej wykazało obecność na hiPS-EVs szeregu antygenów powierzchniowych, obecnych na ich komórkach rodzicielskich, w tym w szczególności markerów obecnych na komórkach pluripotencjalnych: SSEA-4 i Tra-1-60, a także innych antygenów KM, takich jak CD90, CD105 oraz KDR, co może mieć wpływ na możliwość interakcji tych pęcherzyków z powierzchnią komórek docelowych. Co istotne, w błonie hiPS-EVs stwierdzono również obecność tetraspanin, w tym CD9, CD63 oraz CD81, uważanych za markery wzbogacone we frakcji egzosomalnej (416), co potwierdza obecność tej populacji pęcherzyków w badanych próbkach. Warto zaznaczyć, że poszczególne

antygeny występowały w różnym odsetku na subpopulacjach hiPS-EVs. Przykładowo, pomimo bardzo wysokiego procentu obiektów pozytywnych dla SSEA-4 (77,8 ± 0,9 %), jedynie 2,7 ± 0,1 % posiadało antygen Tra-1-60. Podobnie, podczas gdy odsetek hiPS-EVs zawierających CD81 wynosił 49,7 ± 0,4 %, obecność innej tetraspaniny - CD9, stwierdzono tylko na 15,6 ± 1,8 %. Wyniki te z jednej strony świadczyć mogą o heterogenności badanych próbek, a tym samym obecności kilku subpopulacji hiPS-EVs o odmiennym fenotypie, z drugiej zaś potwierdzają wyniki innych grup badawczych, świadczące o możliwości istnienia mechanizmu selektywnego pakowania poszczególnych typów molekuł do wydzielanych przez komórki pęcherzyków (468, 469).

Warto zaznaczyć, że opisana w niniejszej pracy analiza cytometryczna hiPS-EVs była znacznie bardziej zaawansowana, w porównaniu do uprzednio opublikowanej (396), z zastosowaniem dodatkowych kontroli, a także szerszego panelu badanych markerów. Było to możliwe dzięki nabytemu doświadczeniu oraz poczynionej przeze mnie wnikliwej optymalizacji analizy cytometrycznej EVs w toku prowadzonych prac. W szczególności, zastosowanie barwnika RNA Select – wiążącego się do RNA zamkniętego w integralnym pęcherzyku - umożliwiło odrzucenie z analizy obiektów stanowiących zanieczyszczenie próbek hiPS-EVs, w tym m.in. agregatów białkowych lub pozostałości po uszkodzonych pęcherzykach, które utraciły swoją integralność. Dodatkowo, wykazano jednocześnie, że hiPS-EVs zawierają cząsteczki RNA, a obiekty RNA Select^{+} stanowią aż 68,1 ± 7,3 % wszystkich analizowanych cząstek, co świadczy o **znacznym wzbogaceniu próbek hiPS-EVs w pęcherzyki, które zachowały swoją integralność po procesie ich izolacji i przechowywania.**

Ponadto, kolejną nowością było uzupełnienie klasycznej analizy cytometrycznej o obrazowanie indywidualnych obiektów obecnych w próbkach hiPS-EVs, dzięki opracowaniu przeze mnie metody analizy pęcherzyków z zastosowaniem specjalistycznego cytometru obrazowego ImageStream X MkII. Jest to unikatowy system, który dzięki połączeniu wysokoprzepustowej analizy cytometrycznej oraz zalet mikroskopii fluorescencyjnej, otwiera nowe możliwości wieloparametrowej analizy obiektów biologicznych (470). Nowatorskie wykorzystanie tego urządzenia do wizualizacji hiPS-EVs na poziomie pojedynczych pęcherzyków umożliwiło jednoznaczne potwierdzenie obecności EVs o fenotypie wskazanym w badaniach z wykorzystaniem cytometru Apogee, wykluczając jednocześnie ryzyko analizy artefaktów pomiarowych.

Oprócz analizy cytometrycznej, w przeprowadzonych analizach składu biochemicznego hiPS-EVs, zastosowano także technikę Western Blot, która umożliwia półilościową ocenę obecności białek w badanych próbkach. W wykonanych eksperymentach porównywano poziom ekspresji wybranych białek pomiędzy hiPS-EVs, a ich komórkami rodzicielskimi, wykazując wzbogacenie próbek hiPS-EVs w tetraspaniny (CD9, CD63) oraz w syntenינę. Wszystkie te trzy białka wymieniane są obecnie jako markery pęcherzyków egzosomalnych (416). Z drugiej jednak strony, w próbkach hiPS-EVs stwierdzono również obecność kalneksyny, czyli białka występującego w retikulum endoplazmatycznym (416, 417), przy czym ilość tego białka była niższa

w porównaniu z poziomem w komórkach hiPS. Pomimo tego, że białko to występuje w retikulum endoplazmatycznym (417), zatem definiowane jest jako marker niewystępujący w egzosomach, których biogeneza rozpoczyna się w MVBs (416), może ono być obecne w większych pęcherzykach, które odpączkowując z powierzchni błony, zabierają niewielki fragment cytoplazmy. Tym samym, mogą one zawierać odmienne w porównaniu do egzosomów zestawy białek, w tym m.in. kalneksynę (418, 471). Zatem, **wyniki otrzymane metodą Western Blot potwierdzają dane z analizy cytometrycznej oraz pomiarów NTA wskazujące, że badane próbki hiPS-EVs zawierają heterogenną mieszaninę pęcherzyków komórkowych o zróżnicowanej wielkości oraz fenotypie, które jednocześnie spełniają kryteria definicji EVs, opracowane przez ISEV** (416). Należy jednak zaznaczyć, że kryteria te ulegają dynamiczym zmianom, czego przykładem jest artykuł aktualizujący stanowisko towarzystwa ISEV odnośnie wytycznych metodologicznych charakterystyki EVs, który ukazał się w ostatnim czasie (472).

Warto także dodać, że technika Western Blot jako metoda półilościowa, bazuje na analizie porównawczej próbek z uwzględnieniem białka stanowiącego kontrolę endogenną, a tym samym kontrolę nałożenia takiej samej ilości białka na poszczególne studzienki żelu. Jedną z powszechnie akceptowanych tego typu kontroli w testach komórkowych jest β-aktyna. Jednakże, nasze badania oraz wyniki innych grup badających EVs, wskazują na problem z ustaleniem wiarygodnej kontroli egzogennej dla badań dotyczących molekularnej zawartości pęcherzyków (402, 473, 474). Podobnie, w przeprowadzonych na potrzeby niniejszej pracy eksperymentach, pomimo użycia tej samej ilości białka z lizatów hiPS oraz hiPS-EVs, poziom β-aktyny wyraźnie różnił się pomiędzy tymi dwoma typami próbek. Wnioskuje się, że efekt ten może być spowodowany m.in. faktem, że stężenie białka w hiPS-EVs wyznaczone metodą Bradforda jest pomiarem przybliżonym, który odpowiada zawartości białka nie tylko w samych pęcherzykach, ale również w ko-izolowanych zanieczyszczeniach próbki. Zanieczyszczeniami tymi mogą być m.in. białka obecne w samej pożywce, jako czynniki wspomagające wzrost komórek, a także agregaty białkowe wydzielane do pożywki przez komórki. Jest to także związane z brakiem białek, które byłyby tak samo reprezentowane w komórkach, jak i w pęcherzykach. Tym samym, otrzymane rezultaty potwierdzają doniesienia o aktualnych wyzwaniach metodologicznych i trudnościach w jednoznacznej interpretacji wyników analizy ilościowej zawartości białek w EVs (475). Podsumowując, przeprowadzona przeze mnie analiza składu próbek hiPS-EVs potwierdziła, że stanowią one heterogenną mieszaninę pęcherzyków posiadających aktywną biologicznie zawartość.

W związku z powyższym, w kolejnym etapie badań wykorzystano hiPS-EVs w celu zbadania ich wpływu na właściwości biologiczne komórek krwiotwórczych obecnych w KP w warunkach *in vitro*.

Komórki te izolowano jako frakcję $CD34^+$, kierując się licznymi danymi literaturowymi, świadczącymi o wysokim wzbogaceniu populacji komórek o tym fenotypie w HSCs, zarówno LT-HSCs, jak i w progenitory hematopoetyczne o różnym stopniu zróżnicowania (20, 21, 476). Klasyczna metodyka izolacji komórek $CD34^+$

z materiału klinicznego opiera się głównie na sortowaniu magnetycznym frakcji komórek wykazujących ekspresję wspomnianego antygenu, spośród frakcji komórek jednojądrzastych, uzyskanych po wirowaniu pełnej krwi w gradiencie nośnika typu Ficoll, lokujących się w części interfazowej (tzw. *buffy coat*). W badaniach podstawowych oraz przedklinicznych stosuje się zarówno izolację manualną na kolumnach umieszczonych w uchwytach magnetycznych, jak i bardziej wydajne i szybsze sortery automatyczne, np. autoMACS Pro (*Miltenyi Biotec*) (477). Z kolei w praktyce klinicznej, podczas przygotowania materiału do przeszczepu stosuje się zwalidowane systemy, m.in. CliniMACS (*Miltenyi Biotec*) czy ISOLEX 300i (*Baxter*), dopuszczone do użytku przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*; FDA) (478, 479).

Mając na uwadze powyższe, w początkowych etapach eksperymentów stosowano klasyczną metodę izolacji frakcji $CD34^+$ z KP z zastosowaniem separacji przy użyciu sortera autoMACS, poprzedzonej wirowaniem w gradiencie gęstości. Niemniej jednak, na drodze optymalizacji zdecydowano ostatecznie o zastosowaniu odmiennej metodyki pozyskiwania komórek krwiotwórczych z pełnej KP. Konieczność modyfikacji protokołu izolacji, zastosowana w niniejszej pracy, wynikała z obserwacji, że czystość frakcji komórkowych otrzymanych po separacji MACS była niezadowalająca i wynosiła maksymalnie 60-70 %, przy czym odsetek ten różnił się znacząco pomiędzy poszczególnymi izolacjami. Skutkowało to bardzo niską wydajnością ekspansji komórek *ex vivo*, przy jednoczesnej dużej ich śmiertelności. Przegląd danych literaturowych wskazuje na podobne problemy z niską czystością izolacji immunomagnetycznej, napotykane także przez inne zespoły badawcze (480-482). Ponadto, istnieją przesłanki, świadczące o możliwym wpływie nośnika Ficoll na właściwości biologiczne izolowanych z jego zastosowaniem komórek (483-485), co mogłoby wyjaśniać obserwację obniżonej żywotności wyizolowanych w ten sposób frakcji.

W związku z powyższym, w celu zwiększenia czystości badanych frakcji, we wszystkich eksperymentach, których wyniki zamieszczono w niniejszej pracy, komórki $CD34^+$ otrzymywano z KP poprzez zastosowanie kilkuetapowego procesu izolacji, na który składała się liza erytrocytów w obecności roztworu hipotonicznego (zamiast izolacji frakcji komórek jednojądrzastych na nośniku typu Ficoll), wstępne oczyszczanie frakcji wzbogaconej w antygen CD34 metodą immunomagnetyczną (MACS) oraz sortowanie właściwej frakcji $CD34^+$ z zastosowaniem sortowania opartego o znakowanie immunofluorescencyjne (FACS). Warto zaznaczyć, że podobna procedura była uprzednio z powodzeniem stosowana do izolacji bardzo rzadkich populacji KM z KP (183). Co istotne, w pracy tej wykazano, że zastosowanie lizy erytrocytów, zamiast rutynowego wirowania pełnej krwi w gradiencie fikolu, umożliwiło również lepszy odzysk tych komórek (183). Stąd też, po przeprowadzeniu szeregu eksperymentów optymalizacyjnych, zdecydowano o stosowaniu zmodyfikowanego protokołu preparatyki KP we wszystkich eksperymentach omówionych w niniejszej pracy. W ten sposób, **czystość otrzymywanych frakcji $CD34^+$ była powtarzalna i bardzo wysoka, sięgając powyżej 98 %**, a otrzymane

komórki $CD34^+$ poddawano następnie namnażaniu w warunkach *ex vivo*. Co istotne, taka metodyka izolacji skutkowała nie tylko wyższą czystością, ale także znaczącym zwiększeniem tempa ekspansji *ex vivo* otrzymanych komórek $CD34^+$, w porównaniu do komórek izolowanych jedynie za pomocą MACS.

Jednym z kluczowych czynników w próbach ekspansji komórek krwiotwórczych wydaje się być dobór czasu ich hodowli *in vitro*, przy czym protokoły te znacząco różnią się pomiędzy poszczególnymi grupami badawczymi, wynosząc od kilku dni do nawet kilku tygodni (193). Przy planowaniu doświadczeń, należało brać pod uwagę, iż namnażane w hodowli *in vitro* pierwotne komórki HSCs wykazują ograniczoną liczbę podziałów, tracąc przy tym swój potencjał regeneracyjny (253, 254). Z drugiej jednak strony, zbyt krótka ekspansja może skutkować niewystarczającą liczbą komórek zarówno do przeprowadzenia badań podstawowych, jak i do zastosowania ich w praktyce klinicznej.
Zatem, dla potrzeb eksperymentów zaprezentowanych w niniejszej pracy, ekspansję *ex vivo* komórek $CD34^+$ wyizolowanych z KP prowadzono maksymalnie przez 14 dni, gdyż po tym czasie obserwowano wyraźny spadek tempa proliferacji, a także morfologiczne zmiany komórek świadczące o ich różnicowaniu oraz utracie żywotności. Jednocześnie, w 14 dniu hodowli jedynie kilka procent komórek wciąż wykazywało ekspresję antygenu CD34 na swojej powierzchni, co może świadczyć o ich zróżnicowaniu w kierunku dojrzałych komórek krwi, cechujących się często krótkim czasem życia oraz wymagających innych warunków hodowlanych. Ponadto, w prowadzonych badaniach kinetycznych obserwowano istotny spadek ekspresji tego markera pomiędzy dniem 6, a 8 hodowli *in vitro*. Zatem, pomimo zastosowania specjalistycznej pożywki namnażającej, dedykowanej do namnażania HSCs z jednoczesnym utrzymaniem ich stanu macierzystości, komórki te wykazywały spontaniczną utratę potencjału hematopoetycznego w hodowli *in vitro*.

Wnioski z analizy zmian fenotypowych oraz obserwacje zmiennego tempa namnażania się komórek z KP – świadczące o utracie wczesnych rozwojowo HSCs w miarę postępu hodowli *in vitro* – stały się podstawą do wybrania czasu 7- dniowej ekspansji, jako czasu hodowli, w którym wciąż większość komórek wykazywało ekspresję antygenu CD34, zachowując jednocześnie wysoki potencjał proliferacyjny. Tak dobrany czas hodowli umożliwił również namnożenie komórek w celu uzyskania ich wystarczającej liczby do przeprowadzenia dalszych eksperymentów *in vitro* oraz *in vivo*.
Dlatego też, mając na uwadze powyższe, we wszystkich doświadczeniach, w których analizowano wpływ hiPS-EVs na właściwości biologiczne komórek $CD34^+$ z KP w systemie inkubacji krótkoterminowej, komórki te namnażano uprzednio przez tydzień (7 dni).
Należy jednak wspomnieć, że ze względu na rzadką frakcję KM, którą stosowano w ninijeszych badaniach i związaną z tym limitowaną możliwością namnożenia znamiennej liczby komórek $CD34^+$ *ex vivo,* ich liczba dostępna do doświadczeń była ograniczona. Stąd też, w poszczególnych eksperymentach przeprowadzono zmienną

liczbę powtórzeń, starając się przy tym zachować ją na wystarczającym poziomie wiarygodności oraz reprezentatywności, umożliwiającym przeprowadzenie stosownych analiz istotności statystycznej (minimum 3 powtórzenia z wykorzystaniem komórek z różnych jednostek KP). Ponadto, w przypadku większości wyników, obserwowano duży rozrzut otrzymanych rezultatów pomiędzy poszczególnymi powtórzeniami, co jest zjawiskiem typowym dla badań z wykorzystaniem komórek pierwotnych pochodzących od różnych dawców, a tym samym cechujących się dużą zmiennością osobniczą (486). Niemniej jednak, pomimo szeregu wyzwań oraz limitacji, wykorzystanie w badaniach komórek pierwotnych, zamiast unieśmiertelnionej linii komórkowej, wydaje się lepiej odzwierciedlać procesy toczące się w warunkach fizjologicznych, a tym samym dostarcza szeregu interesujących obserwacji oraz wniosków, mających kluczowe znaczenie w przypadku prób przeniesienia otrzymanych wyników badań podstawowych do realiów praktyki klinicznej.

W przeprowadzonych eksperymentach, oprócz optymalizacji metody izolacji komórek krwiotwórczych oraz warunków ich hodowli, kluczowym czynnikiem był również dobór odpowiedniej dawki hiPS-EVs w celu oceny ich wpływu na cechy komórek docelowych.

W początkowych doniesienich literaturowych, dotyczących prac nad aktywnością biologiczną EVs, przyjmowano stężenia bazujące na ilości białka w próbkach EVs (428, 429, 461). Jednakże, coraz częściej uzupełniane lub zastępowane są one parametrem liczby cząstek (487, 488), który wydaje się bardziej odzwierciedlać realną „ilość" stosowanych pęcherzyków. Niemniej jednak, należy pamiętać, że takie obliczenia ilościowe zawsze obarczone są błędem, wynikającym z limitacji aparatury pomiarowej oraz obecności różnego rodzaju zanieczyszczeń w próbkach EVs, które mogą wpływać zarówno na pomiary ilości białka, jak i na kalkulację liczby cząstek (489). Jednocześnie, wciąż brak jest wystandaryzowanych kryteriów i metod pomiaru ilości materiału biologicznego obecnego w próbkach pęcherzyków, co stanowi tym samym aktualne wyzwanie metodologiczne oraz badawcze.

Niemniej jednak, bazując na dotychczasowym stanie wiedzy, w celu ujednolicenia warunków eksperymentalnych we wszystkich przedstawionych w niniejszej pracy doświadczenich na komórkach $CD34^+$, stosowano stałe stężenie hiPS-EVs w pożywce hodowlanej (wynoszące 2 µg białka/ml). Jednocześnie dawka hiPS-EVs wynosząca 1 µg białka przypadała każdorazowo na $2 \cdot 10^5$ komórek $CD34^+$. Obliczenia dokonane na podstawie pomiarów NTA pozwoliły wyznaczyć liczbę cząstek hiPS-EVs odpowiadającą takiemu stężeniu białka, wynoszącą $3{,}0 \pm 1{,}0 \cdot 10^8$ cząstek/ml. Takie stężenie pęcherzyków wybrano na podstawie danych z wcześniejszych eksperymentów optymalizacyjnych, prowadzonych w naszej grupie badawczej oraz na podstawie opublikowanych prac (396, 402).

Warto zaznaczyć, że dawki stosowane przez różne laboratoria różnią się istotnie między sobą i zależą od danego układu eksperymentalnego. Przykładowo, EVs wydzielane przez komórki MSCs były dodawane do hodowli w stężeniu $3{,}2 \cdot 10^7$ cząstek/ml pożywki, przypadającej na $5 \cdot 10^4$ keratynocytów, jako komórek docelowych (487). Z kolei w innym badaniu, fibroblasty skórne były poddawane działaniu

pęcherzyków z komórek MSCs izolowanych ze sznura pępowinowego, w dawce $1 \cdot 10^8$ - $1 \cdot 10^9$ EVs/ml przypadających na $2 \cdot 10^5$ komórek (488). Zatem dawki stosowane w niniejszej pracy wpisują się w zakres stosowany przez innych badaczy.

Co istotne, przeprowadzony przeze mnie przegląd literaturowy pozwolił wnioskować, że większość dotychczasowych prac badawczych dotyczyło interakcji pęcherzyków z adherentnymi komórkami docelowymi o relatywnie dużej powierzchni potencjalnego kontaktu z EVs dodawanymi do pożywki hodowlanej (395, 396, 487, 488). Z kolei, w niniejszej pracy komórkami poddawanymi działaniu EVs były komórki frakcji $CD34^+$, posiadające niewielką średnicę oraz rosnące w zawiesinie w hodowli *in vitro*. Stąd też, czynniki te mogłyby potencjalnie utrudniać bezpośredni kontakt tych komórek z hiPS-EVs, a tym samym przekazanie im aktywnej biologicznie zawartości. Niemniej jednak, zastosowanie mikroskopii fluorescencyjnej umożliwiło wykazanie, że EVs izolowane z komórek hiPS z nadekspresją białka copGFP były w stanie wnikać do komórek $CD34^+$ z KP, lokalizując się w przedziale cytoplazmatycznym, co wskazuje na możliwość przeniesienia przez te pęcherzyki ich aktywnej biologicznie zawartości do tych komórek. Co istotne, zaobserwowano jednocześnie, że w zastosowanych w pracy warunkach eksperymentalnych, nieznaczna tylko część hiPS-EVs nie ulegała internalizacji do wnętrza komórek $CD34^+$ i były to głównie agregaty pęcherzyków, a zatem obiekty zbyt duże, aby efektywnie fuzjować z błoną komórek. Podobne obserwacje mikroskopowe internalizacji EVs do wnętrza komórek obserwowano we wcześniejszych pracach, w tym w publikacjach naszego zespołu (342, 395, 396, 490-492). Co ciekawe, dane literaturowe wskazują, że internalizacja EVs może następować już w ciągu pierwszych kilkunastu minut od ich dodania do pożywki, przy czym dynamika tego procesu zależy również od typu komórek docelowych, będąc bardziej intensywną w przypadku komórek zdolnych do fagocytozy (491).

Możliwość bezpośredniej interakcji hiPS-EVs z komórkami $CD34^+$ z KP w warunkach *in vitro* może prowadzić do przeniesienia ich aktywnej zawartości do komórek, a tym samym wywołania w nich efektu biologicznego (493). Z punktu widzenia potrzeby opracowania nowych strategii namnażania komórek krwiotwórczych z KP *ex vivo*, intersującym było zbadanie wpływu hiPS-EVs na tempo ekspansji tych komórek. Jednakże, przeprowadzone eksperymenty nie wykazały istotnego statystycznie zwiększenia potencjału proliferacyjnego komórek $CD34^+$, poddanych 14-dniowej hodowli w pożywce z dodatkiem hiPS-EVs. Z drugiej jednak strony, dalsze analizy wykazały, że **dodatek pęcherzyków skutkował wzrostem nie tylko aktywności metabolicznej tych komórek, ale także ich potencjału do wielokierunkowego różnicowania** w poszczególne linie komórek krwi. Co istotne, zwiększona ekspresja markerów liniowych na tych komórkach poddanych działaniu hiPS-EVs nie skutkowała jednoczesnym spadkiem odsetka komórek posiadających antygen CD34, w porównaniu do komórek kontrolnych, co może świadczyć o podtrzymaniu puli progenitorów w populacji komórek namnażanej w obecności pęcherzyków. Dodatkowo, analiza zmian poziomu transkrypów dla genów związanych z kontrolą hematopoezy wykazała, że w 4 dniu ekspresja genu CD34 była istotnie

statystycznie wyższa w komórkach namnażanych w pożywce zawierającej hiPS-EVs. Niemniej jednak, analiza cytometryczna wskazuje, że efekt ten nie miał bezpośredniego przełożenia na zmianę poziomu białka dla antygenu CD34 na powierzchni komórek, co może być spowodowane istnieniem dodatkowych, wieletapowych mechanizmów regulacji procesu translacji.

Uzyskane wyniki wskazują zatem, że efekt funkcjonalny wywoływany przez hiPS-EVs zależy ściśle od typu komórek docelowych, gdyż wcześniejsze badania naszej grupy wykazały, że pęcherzyki te działały stymulująco zarówno na różnicowanie, jak i proliferację komórek izolowanych z tkanek serca (396). Ponadto, kilka prac innych grup badawczych świadczy o zwiększeniu ekspansji komórek HSCs z KP, poddanych działaniu EVs wydzielanych przez szpikowe komórki MSCs (461) lub osteoblasty (462, 494). Podobnie, inna grupa badawcza wykazała, że EVs ze szpikowych komórek MSCs hamują różnicowanie frakcji $CD34^+$ z KP (429). Świadczy to o zróżnicowanej odpowiedzi komórek krwiotwórczych z KP na EVs wydzielane przez różne typy komórek. Warto zaznaczyć, że w przeciwieństwie do hiPS, zarówno komórki MSCs, jak i osteoblasty są naturalnymi komponentami szpikowej niszy komórek HSCs, co może warukować odmiennie działanie wydzielanych przez nie EVs, w porównaniu do badanych w niniejszej pracy pęcherzyków pochodzących z komórek puripotencjalnych. Z drugiej jednak strony, we wcześniejszych badaniach wykazano, że EVs pochodzące z linii osteoblastów zwiększały potencjał klonogenny komórek $CD34^+$ z KP *in vitro* (462). Podobny efekt zaobserwowano również w niniejszych badaniach, w przypadku hiPS-EVs, których dodanie do pożywki hodowlanej istotnie zwiększało liczbę kolonii hematopoetycznych utworzonych przez komórki $CD34^+$ w metylocelulozie. Co istotne, efekt ten był obserwowany zarówno po krótkiej stymulacji tymi pęcherzykami uprzednio namnożonych komórek krwiotwórczych, jak i w przypadku komórek $CD34^+$ poddanych ciągłej ekspansji *ex vivo* w pożywce z dodatkiem hiPS-EVs.

Przeprowadzone badania wskazują ponadto, że **hiPS-EVs wykazują aktywność cytoprotekcyjną *in vitro* w porównaniu do komórek $CD34^+$ z KP** poddanych działaniu czynników cytotoksycznych, zmniejszając odsetek komórek w poszczególnych fazach śmierci komórkowej (apoptozy i nekrozy), wywołanej dodatkiem staurosporyny do pożywki hodowlanej. Dane te korelowały ze zwiększoną ekspresją antyapoptotycznego genu BCL-2 w tych komórkach. Ponadto, wyniki te są spójne z poprzednimi badaniami naszego zespołu, świadczącymi o hamowaniu przez hiPS-EVs śmierci pierwotnych komórek serca *in vitro* (396). Podobnie, EVs wydzielane przez mysie komórki iPS również wykazywały działanie cytoprotekcyjne na komórki śródbłonka *in vitro* (395). Dodatkowo, zbliżone rezultaty otrzymały również inne zespoły badawcze, publikując dane świadczące o ochronnej aktywności EVs z komórek iPS, stymulujących mechanizmy naprawcze w różnych jednostkach chorobowych, w tym m.in. w modelu zawału mięśnia sercowego (394) oraz uszkodzenia nabłonka płuc w modelach *in vivo* (392). Co istotne, wykazano również, że pęcherzyki wydzielane przez inne typy komórek, w tym komórki MSCs obecne w niszy szpikowej, są także zdolne do wywoływania sygnału antyapopotycznego w komórkach HSCs z KP (429, 495).

W kolejnych etapach badań *in vitro* prezentowanych w niniejszej pracy doktorskiej, analizowano także czy hiPS-EVs mogą modulować inne właściwości komórek krwiotwórczych z KP, niezwiązane bezpośrednio z możliwością ich ekspansji *ex vivo*, ale wciąż mające istotne znaczenie z punktu widzenia efektywności zasiedlania przez nie nisz szpikowych i podjęcia procesów hematopoezy po przeszczepie. Oceniano m.in. wpływ hiPS-EVs na aktywność chemotaktyczną tych komórek w kierunku gradientu kluczowego dla nich chemoatraktanta- SDF-1. Jak już kilkukrotnie wspomniano w pracy, oś oddziaływania SDF-1-CXCR4 jest jednym z istotnych czynników regulujących migrację komórek krwiotwórczych do nisz szpikowych, wpływając tym samym na powodzenie przeszczepu (65, 66, 422). Jednocześnie, wykazano uprzednio bezpośrednią korelację efektywności chemotaksji tych komórek do SDF-1 w warunkach *in vitro* z ich potencjałem repopulacyjnym *in vivo* (496).

Przeprowadzona w niniejszej pracy analiza z wykorzystaniem zmodyfikowanej komory Boydena wykazała, że **kilkugodzinna inkubacja komórek CD34$^+$ z hiPS-EVs zwiększa ich odpowiedź na gradient SDF-1 *in vitro***. Z drugiej jednak strony, nie zaobserwowano jednocześnie wpływu hiPS-EVs na poziom ekspresji CXCR4 – podstawowego receptora dla SDF-1, na powierzchni tych komórek. Jednakże, wykazano, że wzrost aktywności chemotaktycznej po dodaniu pęcherzyków korelował ze zwiększonym odsetkiem komórek CD34$^+$ reagujących na SDF-1 wzrostem stężenia wolnych jonów Ca^{2+}, który towarzyszy reakcji komórek hematopoetycznych na gradient SDF-1 (423). Ponadto, na podstawie analiz proteomicznych przeprowadzonych w niniejszej pracy, zaobserwowano także wzrost aktywności ścieżki sygnałowania od integryn, a także szlaku związanego z kinazą FAK w komórkach CD34$^+$ poddanych działaniu hiPS-EVs, która również może być zaangażowana w proces migracji komórek (451, 497). Nie można także wykluczyć możliwości, że fuzja EVs z błoną komórkową może prowadzić do zmian jej właściwości biomechanicznych, które w konsekwencji mogą wpływać na reakcję komórki na bodźce zewnętrzne oraz organizację podbłonowego cytoszkieletu uczestniczącego w migracji. Przykładowo wykazano, że EVs uwalniane przez bakterie *Porphyromonas gingivalis* indukują zmiany płynności błony komórkowej neutrofili (498). Ponadto, istnieje szereg przesłanek literaturowych, że nie tylko ekspresja danego białka błonowego, ale także jego rozmieszczenie mogą wpływać na jego aktywność lub powinowactwo do ligandu (499, 500). Zatem, mając na uwadze, iż receptor CXCR4 lokalizuje się głównie w tratwach lipidowych, niewykluczonym jest, że związanie hiPS-EVs z błoną komórek krwiotwórczych może wpływać na rozmieszczenie cząsteczek CXCR4, modulując tym samym odpowiedź komórek HSCs na sygnalizację chemotaktyczną (501), jednakże hipoteza ta wymaga weryfikacji z zastosowaniem specjalistycznej aparatury pomiarowej.

Oprócz osi SDF-1-CXCR4, na zdolność przeszczepionych komórek HSCs do zasiedlania nisz szpikowych wpływa także efektywność ich interakcji z macierzą zewnątrzkomórkową, śródbłonkiem naczyniowym oraz komórkami stromalnymi, obecnymi w SzK (422, 424). Komórki krwiotwórcze podaje się zazwyczaj jako przeszczep dożylny, zatem podczas migracji do niszy szpikowej muszą one pokonać barierę naczyniową, wchodząc w interakcję z komórkami śródbłonkowymi na drodze

oddziaływania z ich molekułami adhezyjnymi, a także białkami ECM. Następnie, komórki te pokonując barierę naczyniową migrują w kierunku nisz, zapewniających im odpowiednie warunki do przeżycia i podjęcia procesów krwiotworzenia (147).

Dlatego, w niniejszej pracy oceniano również wpływ hiPS-EVs na adhezję i oddziaływanie komórek $CD34^+$ izolowanych z KP, z białkiem ECM – fibronektyną oraz komórkami stromalnymi i śródbłonkowymi w warunkach *in vitro*. Uzyskane wyniki wskazują, że **kilkugodzinna inkubacja HSCs z hiPS-EVs wpływa pozytywnie na efektywność ich adhezji** do w/w trzech komponent, mimo iż krytyczna analiza danych ilościowych wskazała raczej, że ten wzrost poziomu adhezji komórek $CD34^+$ poddanych działaniu pęcherzyków w porównaniu do komórek kontrolnych był relatywnie niewielki (pomimo istotności statystycznej). Niemniej jednak, obserwowana skala wspomnianego efektu (tj. wzrost właściwości adhezyjnych komórek krwiotwórczymi z KP na skutek ich oddziaływania z hiPS-EVs), może być przypuszczalnie wystarczająca dla istotnego zwiększenia potencjału tych komórek do zasiedlenia nisz hematopoetycznych po przeszczepie, działając synergistycznie z jednoczesnym wzrostem ich aktywności chemotaktycznej. Warto także wspomnieć, że w kontekście wpływu EVs na adhezję oraz migrację komórek $CD34^+$, hiPS-EVs posiadają niewątpliwą przewagę w porównaniu do pęcherzyków z komórek MSCs, które we wspomnianym wcześniej badaniu nie wykazywały aktywności istotnie zwiększającej efektywność obu tych procesów w komórkach HSCs (461). Ponadto, analiza cytometryczna wykazała, że w komórkach tych **pod wpływem krótkiej inkubacji z hiPS-EVs dochodzi do zwiększenia poziomu antygenu powierzchniowego LFA-1, który jest zaangażowany w proces adhezji oraz migracji komórek HSCs z krwiobiegu w kierunku SzK**, z pośrednim etapem oddziaływania z komórkami ściany naczyń krwionośnych (502). Tym samym, wyniki te mogą również wyjaśniać przyczyny obserwowanego wzrostu aktywności chemotaktycznej oraz adhezyjnej komórek $CD34^+$ po ich inkubacji w pożywce zawierającej dodatek hiPS-EVs. Co ciekawe, analiza cytometryczna wykazała jednocześnie relatywnie niski odsetek hiPS-EVs posiadających antygen LFA-1. Stąd też, prawdopodobną przyczyną wzrostu poziomu tego markera na powierzchni komórek w wyniku ich interakcji z hiPS-EVs nie jest bezpośrednie jego przeniesienie z pęcherzyków, ale stymulacja komórek do prezentacji lub ekspresji tej cząsteczki na ich powierzchni. Jednoczesnie, szybki wzrost poziomu LFA-1 na powierzchni komórek $CD34^+$, obserwany już po 2 godz. ich inkubacji z hiPS-EVs, wskazuje raczej na jego prawdopodobną redystrybucję z przedziału cytoplazmatycznego w kierunku błony, a nie syntezę *de novo*. Potwierdzeniem tej hipotezy mogą być dane literaturowe, świadczące o dynamicznym recyklingu integryn, w tym LFA-1, a także uwalnianiu tego antygenu z wewnątrzkomórkowych rezerwuarów w odpowiedzi na bodźce biochemiczne (503-505). Zatem podsumowując, **zaprezentowane w niniejszej pracy wyniki doświadczeń funkcjonalnych wskazują, że EVs wydzielane przez komórki hiPS mogą wpływać na właściwości biologiczne komórek krwiotwórczych z KP *in vitro*, w tym na te istotne dla ich efektywnej migracji oraz zasiedlania nisz hematopoetycznych i podjęcia procesów hematopoezy**.

Naturalną konsekwencją tych obserwacji eksperymentalnych było pojawienie się pytań dotyczących możliwych mechanizmów molekularnych, odpowiedzialnych za aktywność biologiczną hiPS-EVs i ich wpływ na funkcje komórek HSCs. Przeprowadzony przeze mnie przegląd dostępnej literatury nasuwa wniosek, że rosnące zainteresowanie próbami wykorzystania EVs w naukach biomedycznych skutkuje pojawianiem się szeregu prac wykazujących ich parakrynną interakcję z komórkami docelowymi w szeregu układów eksperymentalnych. Jednakże, większość z tych prac koncentruje się głównie na wykazaniu wpływu EVs lub jego braku na dany typ komórek docelowych, a pomimo znacznych postępów w tej dziedzinie badań, dokładne mechanizmy tych oddziaływań pozostają nieznane.

Obecnie, głównym postulowanym scenariuszem działania jest fakt, iż fuzja EVs z błoną komórkową skutkuje uwalnianiem ich bioaktywnej zawartości, która trafiając następnie do przedziałów wewnątrzkomórkowych, wywołuje adekwatne zmiany fenotypowe w komórkach docelowych (276). Spośród zbadanych dotychczas typów cząstek biologicznych, których obecność wykazano w EVs pochodzących z różnego typu komórek oraz obecnych w płynach ustrojowych, to głównie niskocząsteczkowy RNA, w tym w szczególności miRNA, uważany jest za dominującą komponentę molekularną EVs, odpowiedzialną za ich aktywność w komórkach docelowych (297). Istotnie, obecna wiedza sukcesywnie powiększa się o nowe badania profilowania miRNA w różnych typach EVs. Przykładowo, w pęcherzykach pochodzących z osteoblastów oraz komórek stromy szpikowej wykazano obecność kilku miRNA, które mogą być zaangażowane w regulację hematopoezy (429, 461, 462). Dodatkowo, podobna analiza zawartości biologicznej hiPS-EVs, opublikowana przez nasz zespół, również obejmowała zbadanie obecności miRNA w tych pęcherzykach oraz porównanie jej do ich komórek rodzicielskich (396). Szczegółowa interpretacja tych danych, przeprowadzona przeze mnie w kontekście lepszego zrozumienia mechanizmów - stojących za obserwowanym wpływem hiPS-EVs na funkcje komórek HSCs z KP - wykazała, że pęcherzyki te wzbogacone są m.in. w miR-20a-5p, miR-106a, miR-125a oraz miR-130a, które mogą być ważnymi regulatorami genów związanych z kontrolą procesów hematopoezy. W szczególności, doniesienia literaturowe wskazują, że miR-125a oraz miR-130a ulegają wysokiej ekspresji w populacji komórek LT-HSCs i są zaangażowane w regulację ich proliferacji (506, 507), podczas gdy miR-20a-5p oraz miR-106a są znanymi modulatorami różnicowania komórek krwiotwórczych (508, 509).

Zatem, **uzyskane wyniki odnośnie składu miRNA w hiPS-EVs mogą świadczyć o obecności w nich specyficznych cząsteczek regulatorowego RNA, mogących uczestniczyć w modulowaniu przez te pęcherzyki efektu funkcjonalnego w komórkach HSCs**. Interesującym kierunkiem kontynuacji prowadzonych przeze mnie badań byłoby sprawdzenie w przyszłości czy istotnie poziom wymienionych miRNA ulega zwiększeniu w komórkach $CD34^+$ z KP po ich kontakcie z hiPS-EVs, co mogłoby świadczyć o horyzontalnym transferze tego materiału genetycznego.

Liczne badania naukowe wskazują również, że oprócz miRNA, EVs mogą przenosić cząsteczki mRNA oraz białek, które mogą mieć wpływ na zachowanie

komórek docelowych (293, 428, 510, 511). Dlatego też, w celu zweryfikowania czy podobne mechanizmy odpowiadają za zdolność hiPS-EVs do modulowana funkcji komórek krwiotwórczych z KP, przeprowadziłam analizę zmian profilu ekspresji transkryptów dla wybranych genów związanych z hematopoezą w komórkach $CD34^+$, hodowanych w pożywce z dodatkiem tych pęcherzyków. Uzyskane dane umożliwiły zaobserwowanie kilku interesujących zjawisk związanych z dynamiką zmian transkryptomu, zachodzących w tych komórkach w trakcie ich ekspansji *ex vivo*. Z jednej strony, profil badanych genów był istotnie odmienny w komórkach $CD34^+$ bezpośrednio po ich izolacji z KP, w porównaniu do tych komórek poddanych namnażaniu w warunkach *in vitro*. Poprzednie badania innych grup również wykazały unikalny, odmienny wzór ekspresji genów pomiędzy komórkami HSCs nieaktywnymi mitotycznie, mobilizowanymi oraz tymi o fenotypie białaczkowym (512). Z drugiej strony, **otrzymane przeze mnie wyniki świadczą o zmienionej ekspresji szeregu genów związanych z kontrolą funkcji komórek krwiotwórczych, pod wpływem obecności hiPS-EVs w pożywce namnażającej**. Przykładowo, w warunkach tych nastąpił wzrost poziomu transkryptu dla genu PAX5, którego produktem białkowym jest czynnik transkrypcyjny zaangażowany w regulację rozwoju linii limfocytów B (433). Podobnie, pod wpływem hiPS-EVs zaobserwowałam także zwiększenie ekspresji genów NOTCH1 oraz NOTCH2. Zmiana ta wydaje się być istotna, zważywszy na doniesienia literaturowe, wskazujące, że produkty tych genów biorą nie tylko udział w modulowaniu funkcji komórek hematopoetycznych, ale także odgrywają istotną rolę cytoprotekcyjną wobec komórek HSCs z KP wystawionych na działanie promieniowania γ (434, 513).

W moich badaniach wykazałam także, że obecność hiPS-EVs w pożywce namnażającej skutkowała również wzrostem poziomu transkryptu dla genu RUNX1. Opublikowane prace wskazują, że koduje on kluczowy czynnik transkrypcyjny, wymagany w procesie wczesnej hematopoezy. Z kolei w innych badaniach wykazano, że w dorosłym organizmie jest on negatywnym regulatorem liczby prymitywnych subpopulacji komórek HSCs, pełniąc jednocześnie kluczową rolę w procesie limfopoezy oraz megakariopoezy (437, 514).

Podobnie, stwierdzono w niniejszej pracy, że w komórkach $CD34^+$ namnażanych w obecności hiPS-EVs wzrastała również ekspresja genów dla czynników transkrypcyjnych GATA1 oraz GATA2. Jak zostało wykazane w badaniach innych grup, czynniki te regulują procesy m.in. erytropoezy oraz megakariopoezy (438) oraz mogą promować stan wyciszenia mitotycznego komórek HSCs (515).

Co ciekawe, przeprowadzone przeze mnie analizy wskazują także, że dodatek hiPS-EVs do pożywki namnażającej zwiększał ekspresję genów dla deacetylaz histonowych HDAC5 oraz HDAC7 w badanych tu komórkach $CD34^+$, które to deacetylazy są enzymami zdolnymi do modyfikacji epigenetycznej komórek, skutkującej kondensacją chromatyny, a tym samym hamowaniem transkrypcji (436). Stąd też, podejmuje się próby zastosowania inhibitorów tej klasy enzymów w celu m.in. ekspansji komórek HSCs z KP *ex vivo* (516, 517).

Zatem, **wyniki przeprowadzonej w niniejszej pracy analizy profilu ekspresji genów w komórkach HSCs z KP potwierdzają obserwany przeze mnie**

w badaniach funkcjonalnych - wpływ hiPS-EVs na potencjał tych komórek do różnicowania w kierunku poszczególnych linii hematopoetycznych, przy jednoczesnym braku zwiększenia efektywności ich ekspansji *ex vivo*.

Innym genem o zwiększonej ekspresji w komórkach $CD34^+$ poddanych działaniu hiPS-EVs był FUT10, kodujący enzym fukozylotransferazę 10. Jak już wspomniano, poprzednie badania innych grup badawczych wykazały, że aktywność fukozylaz modyfikujących ligandy dla selektyn obecne na powierzchni komórek krwiotwórczych, może przyczyniać się do poprawy ich wbudowywania się po przeszczepie (262, 263). W opublikowanej pracy wykazano również, że inkubacja komórek krwiotwórczych z KP z fukozylotransferazą zwiększa ich zdolność do interakcji z komórkami naczyń krwionośnych obecnych w SzK (518). Zatem, wykazany przeze mnie wzrost poziomu tego enzymu w wyniku oddziaływania z hiPS-EVs mógłby również częściowo wyjaśniać wykazane w niniejszej pracy zwiększenie adhezji komórek HSCs do komórek śródbłonka. Ponadto, jak już wspomniano, pod wpływem hiPS-EVs nastąpił również wzrost poziomu transkryptu dla genu CCR1 kodującego receptor dla chemokiny CCL3 (439), a podobny efekt wykazano uprzednio w innych badaniach w przypadku inkubacji komórek HSCs z EVs wydzielanymi przez komórki stromalne (429).

Jednocześnie, przeprowadzona przeze mnie analiza zmian ekspresji dwóch genów związanych z procesem hematopoezy: SCL oraz HOXB4, w komórkach $CD34^+$ z KP poddanych krótkiej inkubacji z hiPS-EVs, wykazała wzost ich poziomu po 2 oraz 6 godz. po dodaniu pęcherzyków, korelujący jednocześnie z podwyższonym poziomem antyapoptotycznego genu BCL-2. Dane te mogą tłumaczyć obserwowany efekt cytoprotekcyjny badanych pęcherzyków wobec komórek krwiotwórczych poddanych działaniu staurosporyny, a także odpowiadać za wzrost ich potencjału klonogennego, obserowanego w niniejszej pracy.

Niewątpliwie jednak, w tym kontekście interesującym aspektem dalszych prac byłoby poszerzenie panelu transkryptów objętych analizą w komórkach $CD34^+$ z KP, po ich krótkoterminowej inkubacji z hiPS-EVs, w celu pogłębienia wiedzy z zakresu mechanizmów parakrynnej stymulacji potencjału hematopoetycznego tych komórek w wyniku oddziaływania pęcherzyków z komórek pluripotencjalnych. Podobnie, szczegółowe profilowanie zmian poziomu miRNA w tych komórkach byłoby interesującym aspektem, który również mógłby przyczynić się do lepszego zrozumienia natury obserwowanych zjawisk. Eksperymenty te są obecnie w fazie planowania, jednak ze względu na ograniczenia czasowe, jak również limitowaną dostępność materiału klinicznego, jakim jest KP, nie mogą one zostać włączone do niniejszej rozprawy doktorskiej. Jednak, z pewnością wejdą one w skład publikacji naukowej, przygotowywanej w naszym zespole. Podobnie, oprócz analiz obecności poszczególnych typów RNA w komórkach $CD34^+$ z KP, interesującym byłoby również zbadanie zmian ich globalnego proteomu pod wpływem działania hiPS-EVs.

Niemniej jednak, w kontekście uzyskanych wyników doświadczeń, wskazujących na zmiany funkcjonalne komórek HSCs już po krótkim kontakcie z hiPS-

EVs, zasadnym było zbadanie przeze mnie w jaki sposób interakcja z pęcherzykami wpływa na aktywność w tych komórkach szeregu kinaz białkowych, zaangażowanych w regulację wewnątrzkomórkowych szlaków transdukcji sygnału. Jak wiadomo, jest to jedna z kluczowych ścieżek szybkiej odpowiedzi komórki na bodźce zewnętrzne (440). Istotnie, **zastosowanie macierzy Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Arrays pozwoliło mi na wykazanie w niniejszej pracy, iż 2-godz. inkubacja z hiPS-EVs wpływa na poziom fosforylacji szeregu kinaz, obecnych w komórkach CD34$^+$ z KP**. Zaobserwowałam m.in. globalną aktywację kilku kluczowych szlaków sygnalizacyjnych, w tym Akt/mTOR, STAT lub MAPK, uczestniczących w regulacji właściwości biologicznych komórek HSCs (441, 450). Ponadto, wykazałam wzrost aktywności sygnałowania od kinazy FAK, regulującej procesy adhezji oraz migracji (451), a także aktywację kinaz zaangażowanych w sygnalizację od TGF-β, które, jak wskazują prace innych grup, mogą promować różnicowanie komórek HSCs, wykazując przy tym efekt antyproliferacyjny (519).

Podobnie, klasyfikacja białek z zastosowaniem narzędzia PANTHER ujawniła wpływ hiPS-EVs na aktywność szlaków sygnalizacji od powierzchniowych integryn i kadheryn oraz związanych z PDGF. Co istotne, prace innych zespołów wskazują, że PDGF zdolny jest do promowania namnażania komórek krwiotwórczych z KP *ex vivo*, jednocześnie zwiększając ich potencjał repopulacyjny *in vivo* (520, 521). Wykazałam także, że krótka inkubacja komórek CD34$^+$ z hiPS-EVs skutkowała również aktywacją sygnałowania od endoteliny, która, jak pokazano w pracach innych zespołów, związana może być ze stymulacją ekspansji tych komórek *ex vivo* (522). Niemniej jednak, pomimo danych literaturowych świadczących o zwiększeniu tempa proliferacji *ex vivo* komórek HSCs pod wpływem PDGF oraz endoteliny, w niniejszej pracy nie wykazano pozytywnego wpływu hiPS-EVs na ekspansję tych komórek. Spowodowane to może być faktem, że pomimo aktywacji zbliżonych ścieżek sygnałowania, badane pęcherzyki mogą oddziaływać również na inne receptory i szlaki komórkowe oprócz tych związanych ze wspomnianymi dwoma czynnikami wzrostowymi, co w konsekwencji skutkuje odmiennymi efektami funkcjonalnymi.

Ponadto w niniejszej pracy wykazano, że aktywowane przez hiPS-EVs kinazy mogą być związane ze szlakiem od receptora dla EGF, który, jak wiadomo z innych badań, bierze udział m.in. w promowaniu przeżycia komórek HSCs i regeneracji układu hematopoetycznego po uszkodzeniu wywołanym promieniowaniem γ (523, 524). Kinazy te biorą także udział w sygnałowaniu od FGF, który również może istotnie wpływać na zachowanie komórek krwiotwórczych. Przykładowo, wykazano uprzednio, że kaskada sygnału inicjowana wiązaniem FGF do receptora na powierzchni HSCs, może regulować rekonstytucję układu krwiotwórczego po jego uszkodzeniu za pomocą czynników chemicznych (525).

Analiza PANTHER wykonana przeze mnie w niniejszej pracy wykazała również zmiany w aktywności innych szlaków, ważnych dla przeżycia komórek i kontroli cyklu komórkowego. Przykładem może być szlak sygnałowania od insuliny/IGF, który, jak wykazano w innych pracach, reguluje proliferację i różnicowanie HSCs, działając jednocześnie antyapoptotycznie (526) lub też wspomniana wcześnej sygnalizacja od

TGF-β – czynnika, który w pracy badawczej innych zespołów wykazywał działanie antyproliferacyjne, promując różnicowanie HSCs (519). Ponadto, zaobserwowana przeze mnie zmiana fosforylacji wybranych białek w komórkach $CD34^+$ poddanych działaniu pęcherzyków z komórek hiPS, może także wpływać na aktywność szlaku CCKR, którego udział wykazano uprzednio m.in. w regulacji stężenia wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} w komórkach krwi (527), co mogłoby częściowo tłumaczyć wykazaną przeze mnie wzmożoną odpowiedź chemotaktyczną badanych komórek $CD34^+$ po ich kontakcie z hiPS-EVs.

Przeprowadzona przeze mnie analiza zmian fosforylacji poszczególnych kinaz w komórkach HSCs świadczy także o podwyższeniu aktywności białka AMPK, co prowadzić może do zwiększenia żywotności komórek, jak wykazano w innych badaniach (448, 449). Co ciekawe, w opublikowanej pracy innego zespołu wykazano także, że spadek fosforylacji AMPK prowadzi do wyczerpania puli szpikowych komórek HSCs, spadku ich potencjału repopulacyjnego oraz zwiększenia ich śmiertelności na drodze apoptozy (528).

Podsumowując, **zarówno analiza ekspresji genów, jak również aktywacji kinaz biorących udział w regulacji wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowania, potwierdza i wyjaśnia w pewnym zakresie wpływ hiPS-EVs na właściwości biologiczne komórek krwiotwórczych z KP, wykazany w badaniach funkcjonalnych, przeprowadzonych przeze mnie w warunkach *in vitro***. Jednocześnie, wnikliwa analiza wszystkich danych uzyskanych w dotychczas omówionych eksperymentach zdaje się nasuwać wniosek o możliwości dwojakiego rodzaju oddziaływania hiPS-EVs na komórki $CD34^+$ z KP. Z jednej strony, aktywność tych pęcherzyków może wynikać z przenoszenia przez nie bioaktywnej zawartości, dostarczającej egzogennych białek oraz kwasów nukleinowych, a tym samym prowadząc do wzrostu ich poziomu w komórkach docelowych. Z drugiej jednak strony, obserwowane efekty funkcjonalne działania hiPS-EVs mogą być też związane z bezpośrednią aktywacją przez nie szlaków sygnałowych w komórce docelowej. W szczególności, oddziaływanie pęcherzyków o specyficznym składzie molekularnym na dane ścieżki sygnalizacyjne może prowadzić do synergistycznej lub plejotropowej reakcji komórki, przejawiającej się zmianą aktywności innych szlaków biochemicznych. Potwierdzeniem tej hipotezy może być fakt, że np. obserwowany przeze mnie wzrost aktywności chemotaktycznej komórek $CD34^+$ z KP w gradiencie SDF-1 po ich inkubacji z hPS-EVs nie wiązał się ze zwiększeniem przez te pęcherzyki ekspresji receptora dla tej chemokiny. Jednakże, analiza molekularna wykazała, że hiPS-EVs mogą wpływać na aktywność genów oraz ścieżek sygnalizacyjnych, które regulują aktywnosc migracyjną tych komórek. Innym przykładem jest wzrost poziomu markera LFA-1 na powierzchni komórek $CD34^+$ po ich kontakcie z hiPS-EVs, który, jak wykazano, prawdopodobnie nie jest związany z bezpośrednim przeniesieniem tego antygenu z pęcherzyków na komórki.

Końcowym, a jednocześnie kluczowym etapem prac objętych niniejszą rozprawą było zbadanie czy obserwowany w testach *in vitro* wpływ hiPS-EVs na

właściwości biologiczne komórek $CD34^+$ z KP znajdzie również swoje odzwierciedlenie w poprawie funkcji hematopoetycznych tych komórek *in vivo*. Stąd też, zastosowano model przeszczepu komórek krwiotwórczych do myszy szczepu NOD/SCID poddanych radiacyjnej mieloablacji, będący złotym standardem oceny potencjału repopulacynego komórek HSCs, stosowanym powszechnie w badaniach na całym świecie.

Istotnie, **uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że komórki $CD34^+$ z KP poddane uprzedniemu namnożeniu, a następnie inkubacji z hiPS-EVs przez 2 godz. w warunkach *ex vivo,* zasiedlają nisze hematopoetyczne po przeszczepie w sposób bardziej efektywny**, w porównaniu do komórek niepoddanych działaniu tych pęcherzyków. Podobnie, również w eksperymencie długoterminowym zaobserwowano, **że interakcja tych komórek z hiPS-EVs bezpośrednio przed przeszczepem poprawia ich zdolność do wbudowania w niszy szpikowej myszy, prowadząc tym samym do lepszej rekonstytucji układu hematopoetycznego i powstania chimeryzmu szpikowego**, przejawiającego się także wzrostem liczby ludzkich komórek w innych tkankach myszy, w tym w krwi obwodowej oraz śledzionie. Jednocześnie, komórki te po 8 tygodniach od podania wciąż zachowywały zdolność do tworzenia kolonii hematopoetycznych w teście CFC. Uzyskane w ten sposób wyniki stanowią zatem kluczowe potwierdzenie oraz dopełnienie przeprowadzonych przeze mnie licznych eksperymentów w warunkach *in vitro*, opisanych w niniejszej pracy. Ponadto, są one niezwykle istotne z punktu widzenia poszukiwania strategii zwiększających szansę na powodzenie przeszczepu komórek pochodzących z KP u dorosłych pacjentów. Jak już kilkukrotnie wspomniano, opóźnione wszczepienie prowadzące do nieefektywnej rekonstytucji jest jednym z kluczowych problemów limitujących możliwości zastosowania KP w praktyce klinicznej (168, 214).

Co istotne, wyniki przeprowadzonych przeze mnie doświadczeń *in vivo* mogą również świadczyć o przewadze hiPS-EVs w porównaniu do EVs wydzielanych przez inne typy komórek, ze względu na ich molekularną zawartość. Przykładowo, w pracy Morhayima i in. wykazano, że pomimo iż komórki $CD34^+$ wyizolowane z KP i traktowane EVs pochodzącymi z osteoblastów zachowują swoją zdolność do wszczepiania u myszy NOD/SCID, to jednak procent chimeryzmu szpikowego był na poziomie podobnym do tego dla komórek kontrolnych, nietraktowanych pęcherzykami (462). Z drugiej jednak strony, w innej pracy wykazano, że zastosowanie EVs pochodzących zarówno z mysich, jak i ludzkich komórek stromalnych szpiku skutkowało zmniejszeniem uszkodzenia SzK u napromieniowanych myszy, zwiększając jednocześnie efektywność rekonstytucji hematopoetycznej po przeszczepie komórek krwiotwórczych (495).

Warto także wspomnieć, że na stosunkowo niski stopień chimeryzmu szpikowego po przeszczepie, uzyskany w moich badaniach *in vivo*, wpływ miał także fakt, że podawano myszom komórki $CD34^+$ poddane uprzednio 7-dniowej ekspansji *ex vivo*, a nie bezpośrednio po ich izolacji, jak ma to miejsce w praktyce kliniczej. Podobnie jak w przypadku pozostałych eksperymentów, spowodowane to było głównie koniecznością namnożenia komórek w celu uzyskania ich odpowiedniej liczby,

wystarczającej do przeszczepienia reprezentatywnej liczby zwierząt. Zatem, w interpretacji uzyskanych danych liczbowych należy brać pod uwagę przesłanki literaturowe, świadczące o spadku potencjału repopulacyjnego komórek HSCs w trakcie ich hodowli *in vitro* (253). Co istotne, w opublikowanych uprzednio wynikach testu kompetycyjnego *in vivo* wykazano, że komórki HSCs z KP poddane ekspansji wykazywały upośledzoną zdolność do rekonstytucji układu hematopoetycznego w porównaniu do komórek nienamnażanych (529). Mimo tego, wykazałam jednak istotną różnicę pomiędzy stopniem wszczepienia takich komórek po wcześniejszej inkubacji z hiPS-EVs w porównaniu z komórkami kontrolnymi – na korzyść tych pierwszych.

W kontekście wspomnianych wyżej doniesień oraz moich dalszych planów eksperymentalnych, interesującym byłoby zatem zbadanie czy wykazany przeze mnie pozytywny wpływ hiPS-EVs na zasiedlanie nisz hematopoetycznych przez komórki $CD34^+$ namnażane *in vitro,* będzie również podobny w przypadku komórek bezpośrednio po ich izolacji. Jednocześnie, pozwoliłoby to zbadać kinetykę zmian potencjału hematopoetycznego *in vivo* komórek $CD34^+$ z KP w trakcie ich ekspansji w warunkach hodowlanych, zoptymalizowanych na potrzeby doświadczeń prezentowanych w niniejszej pracy. Ponadto, ciekawym podejściem byłoby również zbadanie wpływu namnażania tych komórek w pożywce z dodatkiem hiPS-EVs na ich funkcje krwiotwórcze *in vivo*.

Niemniej jednak, **przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki wskazują, że hiPS-EVs oddziałują z komórkami $CD34^+$ izolowanymi z KP, wywołując w nich zróżnicowany efekt funkcjonalny, zależny od czasu ko-inkubacji**. Jednocześnie, wnikliwa analiza uzyskanych danych zdaje się przemawiać za wnioskiem, że bardziej korzystną z punktu widzenia efektywności wpływu na funkcje biologiczne tych komórek jest strategia krótkoterminowej (kilkugodzinnej) stymulacji pęcherzykami, w porównaniu do ich ciągłej ekspansji w obecności hiPS-EVs. Takie podejście wydaje się mieć też istotną przewagę dla potencjalnej możliwości rozwoju nowej metodyki zwiększania efektywności terapeutycznej KP w praktyce klinicznej, opartej o pre-kondycjonowanie komórek krwiotwórczych za pomocą hiPS-EVs. Jednorazowa, krótka stymulacja komórek generowałaby znacznie niższe koszty związane z mniejszym zużyciem próbek pęcherzyków oraz odczynników wymaganych do ich przygotowania. Ponadto, podejście to niosłoby ze sobą mniejszą konieczność manipulacji komórek, a tym samym obniżenie ryzyka ewentualnej kontaminacji i stopnia skomplikowania procedur systemu GMP, jeśli takie miałyby zostać opracowane dla wspomnianych strategii namnażania. Niemniej jednak, jednoznaczny wybór procedury przygotowania produktu leczniczego wymaga dalszych badań i procesu wnikliwej optymalizacji.

Podsumowując, w niniejszej pracy przeprowadzono wieloaspektową analizę wpływu hiPS-EVs na szereg właściwości biologicznych oraz funkcji hematopoetycznych komórek $CD34^+$ izolowanych z KP. Bazując na kompleksowym przeglądzie światowej literatury, z uwzględnieniem doniesień historycznych oraz bieżących trendów, w badaniach posłużyłam się szeregiem technik z zakresu biologii

komórki, analizy molekularnej oraz testów funkcjonalnych, prowadzonych zarówno w warunkach *in vitro,* jak i *in vivo,* stosując wysokospecjalistyczną aparaturę badawczą. Ponadto, przeprowadziłam szereg doświadczeń optymalizacyjnych, mających na celu udoskonalenie oraz opracowanie nowych protokołów metodologicznych, w szczególności w kontekście zaawansowanej analizy jakościowej i ilościowej próbek EVs, a także strategii izolacji i namnażania komórek krwiotwórczych z KP. Pozwoliło to uzyskać szereg interesujących i nowatorskich rezultatów, stanowiących istotną bazę do dalszych badań podstawowych oraz translacyjnych.

Według mojej wiedzy, nasza grupa badawcza jako pierwsza podjęła próbę zastosowania hiPS-EVs do modyfikacji funkcjonalnej komórek HSCs izolowanych z KP. Otrzymane przeze mnie wyniki przyczynią się do poszerzenia obecnego stanu wiedzy w zakresie badań podstawowych, dotyczących biologicznej zawartości oraz aktywności parakrynnej pęcherzyków wydzielanych przez komórki iPS. Ponadto, przeprowadzone przeze mnie badania stanowią istotny wkład w próbach poprawy efektywności terapeutycznej i potencjalnego zastosowania komórek krwiotwórczych z KP w regeneracji układu hematopoetycznego.

Zatem, w dalszej perspektywie rezultaty niniejszej rozprawy doktorskiej mogą mieć istotne znaczenie praktyczne z punktu widzenia wykorzystania uzyskanych wyników w opracowaniu nowych strategii zwiększania możliwości wykorzystania komórek krwiotwórczych izolowanych z KP w leczeniu schorzeń hematologicznych. Tym samym, badania te wpisują się w obecne trendy badawcze, stanowiąc potencjalnie istotny wkład dla zrozumienia mechanizmów aktywności biologicznej EVs oraz poszerzenia możliwości ich zastosowania w naukach biomedycznych, w szczególności w kontekście bieżących wyzwań i potrzeb hematologii klinicznej.

6. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI KOŃCOWE

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zbadanie wpływu hiPS-EVs na właściwości biologiczne i potencjał hematopoetyczny komórek HSCs z KP, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Związany był on z próbą podjęcia istotnego wyzwania badawczego dotyczącego poznania mechanizmów aktywności biologicznej EVs wydzielanych przez komórki hiPS, wobec komórek krwiotwórczych izolowanych z KP, stanowiącej źródło KM do zastosowań klinicznych. Ponadto, przeprowadzone doświadczenia stanowią istotny wkład w badania nad możliwościami potencjalnego zastosowania tych pęcherzyków w naukach biomedycznych, w tym w kontekście zwiększenia możliwości wykorzystania komórek krwiotwórczych izolowanych z KP w hematologii transplantacyjnej.

Podsumowanie wyników

Do najważniejszych wyników uzyskanych w ramach realizacji badań prezentowanych w niniejszej rozprawie doktorskiej zaliczyć można następujące obserwacje:

1. hiPS-EVs stanowią heterogenną mieszaninę nanopęcherzyków, zawierających białka typowe dla EVs oraz markery powierzchniowe charakterystyczne dla ich komórek rodzicielskich.

2. EVs wydzielane przez komórki hiPS są zdolne do interakcji z komórkami $CD34^+$ wyizolowanymi z KP i poddanymi hodowli *ex vivo* oraz mogą być przez nie internalizowane.

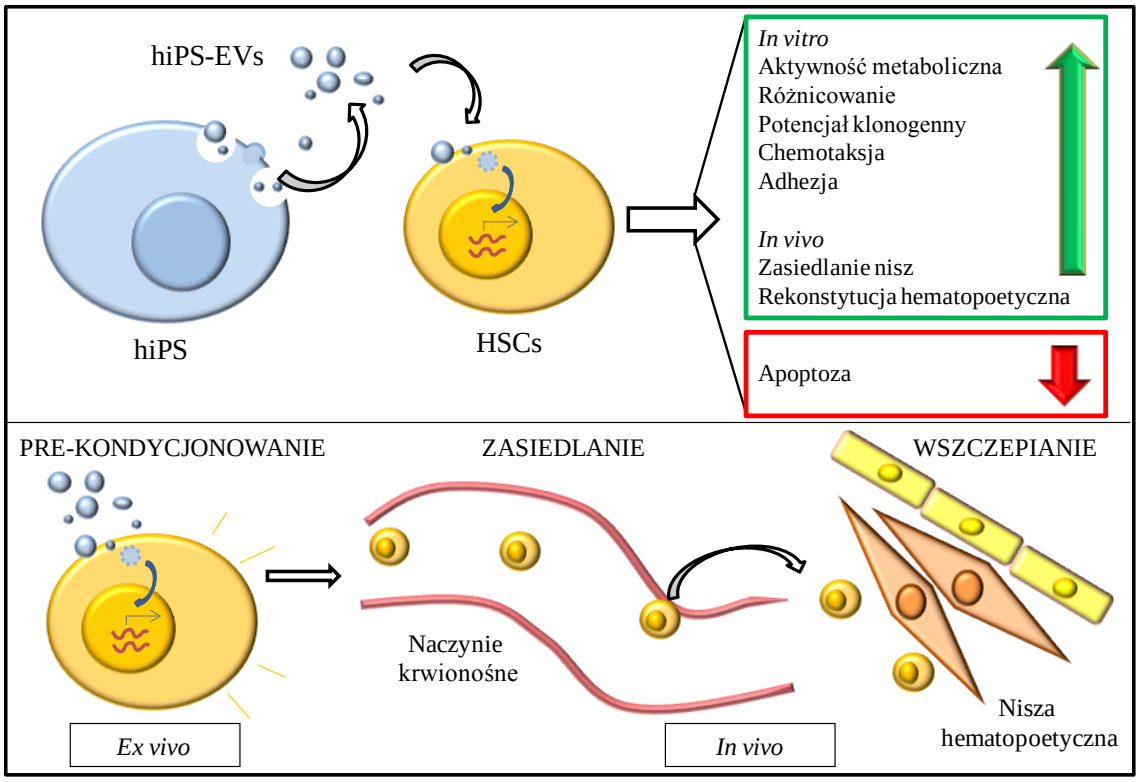
3. hiPS-EVs nie zwiększają tempa proliferacji komórek krwiotwórczych z KP *ex vivo*, ale zwiększają ich aktywność metaboliczną oraz potencjał klonogenny, a także promują przeżywalność tych komórek w warunkach cytotoksycznych *in vitro*.

4. hiPS-EVs zwiększają aktywność chemotaktyczną komórek $CD34^+$ z KP w gradiencie SDF-1 *in vitro*, przy czym efekt ten nie jest związany ze zmianą ekspresji receptora CXCR4, ale może być spowodowany m.in. wpływem pęcherzyków na wzrost stężenia wolnych jonów wapnia w tych komórkach w odpowiedzi na obecność chemoatraktanta.

5. hiPS-EVs zwiększają adhezję komórek $CD34^+$ z KP do białek macierzy zewnątrzkomórkowej, a także komórek stromalnych i śródbłonka naczyniowego *in vitro*, a efekt ten może być związany ze wzrostem poziomu molekuł adhezyjnych na powierzchni tych komórek.

6. hiPS-EVs aktywują ekspresję szeregu genów oraz wpływają na aktywność wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowania w komórkach $CD34^+$ z KP, uczestniczących w kontroli funkcji komórek krwiotwórczych.

7. hiPS-EVs zwiększają efektywność zasiedlania nisz hematopoetycznych oraz poziom rekonstytucji układu krwiotwórczego przez komórki $CD34^+$ izolowane z KP w mysim modelu *in vivo*.



Rycina 44. Schemat podsumowujący najważniejsze wyniki uzyskane w niniejszej pracy.

Wnioski końcowe

Najważniejszymi wnioskami płynącymi z przedstawionych badań są:

1. hiPS-EVs oddziałują z komórkami krwiotwórczymi izolowanymi z KP, wpływając na ich właściwości funkcjonalne istotne z punktu widzenia efektywności rekonstytucji układu hematopoetycznego po ich przeszczepie.

2. Wykorzystanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez komórki hiPS może stanowić nową, obiecującą strategię zwiększania potencjału hematopoetycznego komórek HSCs z KP w protokołach pre-kondycjonowania *ex vivo*, a tym samym przyczyniać się do poprawy możliwości zastosowania tego materiału przeszczepowego w praktyce klinicznej.

7. SPIS PIŚMIENNICTWA

1. Bindu A H, B S. Potency of Various Types of Stem Cells and their Transplantation. *J Stem Cell Res Ther*. 2011; 1:115.

2. Tuch BE. Stem cells--a clinical update. *Aust Fam Physician*. 2006;35(9):719-21.

3. Vezzani B, Pierantozzi E, Sorrentino V. Mesenchymal stem cells: from the perivascular environment to clinical applications. *Histol Histopathol*. 2018: 33(12):1235-1246.

4. Klimczak A, Kozlowska U. Mesenchymal Stromal Cells and Tissue-Specific Progenitor Cells: Their Role in Tissue Homeostasis. *Stem Cells Int*. 2016;2016:4285215.

5. Wagers AJ, Conboy IM. Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis. *Cell*. 2005;122(5):659-67.

6. Klimczak A, Kozlowska U, Kurpisz M. Muscle Stem/Progenitor Cells and Mesenchymal Stem Cells of Bone Marrow Origin for Skeletal Muscle Regeneration in Muscular Dystrophies. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2018; 66(5):341-354.

7. Lacerda-Pinheiro S, Dimitrova-Nakov S, Harichane Y, Souyri M, Petit-Cocault L, Legres L, et al. Concomitant multipotent and unipotent dental pulp progenitors and their respective contribution to mineralised tissue formation. *Eur Cell Mater*. 2012;23:371-86.

8. Haas S, Trumpp A, Milsom MD. Causes and Consequences of Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity. *Cell Stem Cell*. 2018;22(5):627-38.

9. Visvader JE, Clevers H. Tissue-specific designs of stem cell hierarchies. *Nat Cell Biol*. 2016;18(4):349-55.

10. Majo F, Rochat A, Nicolas M, Jaoudé GA, Barrandon Y. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature*. 2008;456:250.

11. Pelosi E, Castelli G, Testa U. Endothelial progenitors. *Blood Cells Mol Dis*. 2014;52(4):186-94.

12. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.

13. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.

14. Menon S, Shailendra S, Renda A, Longaker M, Quarto N. An Overview of Direct Somatic Reprogramming: The Ins and Outs of iPSCs. *Int J Mol Sci*. 2016;17(1).

15. Moore MAS. Chapter 47 - Hematopoietic Stem Cells A2 - Lanza, Robert. In: Langer R, Vacanti J, editors. Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition). Boston: Academic Press; 2014. p. 989-1040.

16. Owen RD. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. *Science*. 1945;102(2651):400-1.

17. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*. 1953;172(4379):603-6.

18. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. 1961. *Radiat Res*. 2012;178(2):Av3-7.

19. Becker AJ, Mc CE, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963;197:452-4.

20. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol*. 1984;133(1):157-65.

21. Berenson RJ, Andrews RG, Bensinger WI, Kalamasz D, Knitter G, Buckner CD, et al. Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *J Clin Invest*. 1988;81(3):951-5.

22. Simmons DL, Satterthwaite AB, Tenen DG, Seed B. Molecular cloning of a cDNA encoding CD34, a sialomucin of human hematopoietic stem cells. *J Immunol*. 1992;148(1):267-71.

23. Greaves MF, Brown J, Molgaard HV, Spurr NK, Robertson D, Delia D, et al. Molecular features of CD34: a hemopoietic progenitor cell-associated molecule. *Leukemia*. 1992;6 Suppl 1:31-6.

24. Deterding LJ, Williams JG, Humble MM, Petrovich RM, Wei S-J, Trempus CS, et al. CD34 Antigen: Determination of Specific Sites of Phosphorylation In Vitro and In Vivo. *International journal of mass spectrometry*. 2011;301(1-3):12-21.

25. Fackler MJ, Civin CI, Sutherland DR, Baker MA, May WS. Activated protein kinase C directly phosphorylates the CD34 antigen on hematopoietic cells. *J Biol Chem*. 1990;265(19):11056-61.

26. Baumheter S, Singer MS, Henzel W, Hemmerich S, Renz M, Rosen SD, et al. Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science*. 1993;262(5132):436-8.

27. Drew E, Merzaban JS, Seo W, Ziltener HJ, McNagny KM. CD34 and CD43 inhibit mast cell adhesion and are required for optimal mast cell reconstitution. *Immunity*. 2005;22(1):43-57.

28. Healy L, May G, Gale K, Grosveld F, Greaves M, Enver T. The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(26):12240-4.

29. Felschow DM, McVeigh ML, Hoehn GT, Civin CI, Fackler MJ. The adapter protein CrkL associates with CD34. *Blood*. 2001;97(12):3768-75.

30. Cheng J, Baumhueter S, Cacalano G, Carver-Moore K, Thibodeaux H, Thomas R, et al. Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34. *Blood*. 1996;87(2):479-90.

31. Drew E, Merkens H, Chelliah S, Doyonnas R, McNagny KM. CD34 is a specific marker of mature murine mast cells. *Exp Hematol*. 2002;30(10):1211-8.

32. Poblet E, Jimenez F, Godinez JM, Pascual-Martin A, Izeta A. The immunohistochemical expression of CD34 in human hair follicles: a comparative study with the bulge marker CK15. *Clin Exp Dermatol*. 2006;31(6):807-12.

33. Ziegler BL, Valtieri M, Porada GA, De Maria R, Muller R, Masella B, et al. KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science*. 1999;285(5433):1553-8.

34. Murray LJ, Tsukamoto A, Hoffman R. CD34+Thy-1+Lin- stem cells from mobilized peripheral blood. *Leuk Lymphoma*. 1996;22(1-2):37-42.

35. de Wynter EA, Buck D, Hart C, Heywood R, Coutinho LH, Clayton A, et al. CD34+AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD/SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors. *Stem Cells*. 1998;16(6):387-96.

36. Hess DA, Wirthlin L, Craft TP, Herrbrich PE, Hohm SA, Lahey R, et al. Selection based on CD133 and high aldehyde dehydrogenase activity isolates long-term reconstituting human hematopoietic stem cells. *Blood*. 2006;107(5):2162-9.

37. Gallacher L, Murdoch B, Wu DM, Karanu FN, Keeney M, Bhatia M. Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood*. 2000;95(9):2813-20.

38. Guo Y, Lubbert M, Engelhardt M. CD34- hematopoietic stem cells: current concepts and controversies. *Stem Cells*. 2003;21(1):15-20.

39. Bhatia M, Bonnet D, Murdoch B, Gan OI, Dick JE. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. *Nat Med*. 1998;4(9):1038-45.

40. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Zeng H, Ogawa M. Reversible expression of CD34 by adult human bone marrow long-term engrafting hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. 2003;31(5):406-12.

41. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M. Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells. *Exp Hematol*. 1998;26(4):353-60.

42. Fujisaki T, Berger MG, Rose-John S, Eaves CJ. Rapid differentiation of a rare subset of adult human lin(-)CD34(-)CD38(-) cells stimulated by multiple growth factors in vitro. *Blood*. 1999;94(6):1926-32.

43. Nakamura Y, Ando K, Chargui J, Kawada H, Sato T, Tsuji T, et al. Ex vivo generation of CD34(+) cells from CD34(-) hematopoietic cells. *Blood*. 1999;94(12):4053-9.

44. Altin JG, Sloan EK. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol Cell Biol*. 1997;75(5):430-45.

45. Craig W, Poppema S, Little MT, Dragowska W, Lansdorp PM. CD45 isoform expression on human haemopoietic cells at different stages of development. *Br J Haematol*. 1994;88(1):24-30.

46. Shah VO, Civin CI, Loken MR. Flow cytometric analysis of human bone marrow. IV. Differential quantitative expression of T-200 common leukocyte antigen during normal hemopoiesis. *J Immunol*. 1988;140(6):1861-7.

47. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*. 1996;183(4):1797-806.

48. Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, et al. Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. *Nat Med*. 1997;3(12):1337-45.

49. Scharenberg CW, Harkey MA, Torok-Storb B. The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors. *Blood*. 2002;99(2):507-12.

50. Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poeppl A, Jurisica I, Dick JE. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science*. 2011;333(6039):218-21.

51. Uchida N, Combs J, Chen S, Zanjani E, Hoffman R, Tsukamoto A. Primitive human hematopoietic cells displaying differential efflux of the rhodamine 123 dye have distinct biological activities. *Blood*. 1996;88(4):1297-305.

52. Wang K, Wei G, Liu D. CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Experimental hematology & oncology*. 2012;1(1):36.

53. Ziegler-Heitbrock HW, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today*. 1993;14(3):121-5.

54. Fajtova M, Kovarikova A, Svec P, Kankuri E, Sedlak J. Immunophenotypic profile of nucleated erythroid progenitors during maturation in regenerating bone marrow. *Leuk Lymphoma*. 2013;54(11):2523-30.

55. Ferraro F, Celso CL, Scadden D. Adult stem cells and their niches. *Advances in experimental medicine and biology*. 2010;695:155-68.

56. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014;505(7483):327-34.

57. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2010;2(6):640-53.

58. Birbrair A, Frenette PS. Niche heterogeneity in the bone marrow. *Ann N Y Acad Sci*. 2016;1370(1):82-96.

59. Yu VW, Scadden DT. Heterogeneity of the bone marrow niche. *Curr Opin Hematol*. 2016;23(4):331-8.

60. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*. 2003;425(6960):836-41.

61. Kunisaki Y, Bruns I, Scheiermann C, Ahmed J, Pinho S, Zhang D, et al. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*. 2013;502(7473):637-43.

62. Xie Y, Yin T, Wiegraebe W, He XC, Miller D, Stark D, et al. Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature*. 2009;457(7225):97-101.

63. Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA, et al. Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell*. 2006;124(2):407-21.

64. Ehninger A, Trumpp A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *The Journal of Experimental Medicine*. 2011;208(3):421-8.

65. Gebura K, Bogunia-Kubik K. [Clinical relevance of chemokine receptor CXCR4]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2012;66:252-66.

66. Kucia M, Reca R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, et al. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells*. 2005;23(7):879-94.

67. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003;425(6960):841-6.

68. Taichman RS, Emerson SG. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J Exp Med*. 1994;179(5):1677-82.

69. Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood*. 2004;103(9):3258-64.

70. Kiel MJ, Radice GL, Morrison SJ. Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance. *Cell Stem Cell*. 2007;1(2):204-17.

71. Bromberg O, Frisch BJ, Weber JM, Porter RL, Civitelli R, Calvi LM. Osteoblastic N-cadherin is not required for microenvironmental support and regulation of hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2012;120(2):303-13.

72. Greenbaum AM, Revollo LD, Woloszynek JR, Civitelli R, Link DC. N-cadherin in osteolineage cells is not required for maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood*. 2012;120(2):295-302.

73. Stier S, Ko Y, Forkert R, Lutz C, Neuhaus T, Grunewald E, et al. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med*. 2005;201(11):1781-91.

74. Kumar S, Geiger H. HSC Niche Biology and HSC Expansion Ex Vivo. *Trends Mol Med*. 2017;23(9):799-819.

75. Fujisaki J, Wu J, Carlson AL, Silberstein L, Putheti P, Larocca R, et al. In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche. *Nature*. 2011;474(7350):216-9.

76. Zhao M, Perry JM, Marshall H, Venkatraman A, Qian P, He XC, et al. Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. *Nat Med*. 2014;20(11):1321-6.

77. Yamazaki S, Ema H, Karlsson G, Yamaguchi T, Miyoshi H, Shioda S, et al. Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell*. 2011;147(5):1146-58.

78. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature*. 2012;481(7382):457-62.

79. Naveiras O, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*. 2009;460(7252):259-63.

80. Zhou BO, Yu H, Yue R, Zhao Z, Rios JJ, Naveiras O. Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. 2017;19(8):891-903.

81. Poulos MG, Guo P, Kofler NM, Pinho S, Gutkin MC, Tikhonova A, et al. Endothelial Jagged-1 is necessary for homeostatic and regenerative hematopoiesis. *Cell Rep*. 2013;4(5):1022-34.

82. Mancini SJ, Mantei N, Dumortier A, Suter U, MacDonald HR, Radtke F. Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood*. 2005;105(6):2340-2.

83. Malhotra S, Kincade PW. Wnt-related molecules and signaling pathway equilibrium in hematopoiesis. *Cell Stem Cell*. 2009;4(1):27-36.

84. Staal FJ, Luis TC. Wnt signaling in hematopoiesis: crucial factors for self-renewal, proliferation, and cell fate decisions. *J Cell Biochem*. 2010;109(5):844-9.

85. Luis TC, Weerkamp F, Naber BA, Baert MR, de Haas EF, Nikolic T, et al. Wnt3a deficiency irreversibly impairs hematopoietic stem cell self-renewal and leads to defects in progenitor cell differentiation. *Blood*. 2009;113(3):546-54.

86. Trowbridge JJ, Guezguez B, Moon RT, Bhatia M. Wnt3a activates dormant c-Kit(-) bone marrow-derived cells with short-term multilineage hematopoietic reconstitution capacity. *Stem Cells*. 2010;28(8):1379-89.

87. Koch U, Wilson A, Cobas M, Kemler R, Macdonald HR, Radtke F. Simultaneous loss of beta- and gamma-catenin does not perturb hematopoiesis or lymphopoiesis. *Blood*. 2008;111(1):160-4.

88. Kabiri Z, Numata A, Kawasaki A, Edison, Tenen DG, Virshup DM. Wnts are dispensable for differentiation and self-renewal of adult murine hematopoietic stem cells. 2015;126(9):1086-94.

89. Zhao C, Blum J, Chen A, Kwon HY, Jung SH, Cook JM, et al. Loss of beta-catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells in vivo. *Cancer Cell*. 2007;12(6):528-41.

90. Kim JA, Kang YJ, Park G, Kim M, Park YO, Kim H, et al. Identification of a stroma-mediated Wnt/beta-catenin signal promoting self-renewal of hematopoietic stem cells in the stem cell niche. *Stem Cells*. 2009;27(6):1318-29.

91. Reagan MR, Rosen CJ. Navigating the bone marrow niche: translational insights and cancer-driven dysfunction. *Nat Rev Rheumatol*. 2016;12(3):154-68.

92. Greenbaum A, Hsu YM, Day RB, Schuettpelz LG, Christopher MJ, Borgerding JN, et al. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature*. 2013;495(7440):227-30.

93. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006;25(6):977-88.

94. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. 2004;118(2):149-61.

95. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell*. 2007;1(6):685-97.

96. Himburg HA, Harris JR, Ito T, Daher P, Russell JL, Quarmyne M, et al. Pleiotrophin regulates the retention and self-renewal of hematopoietic stem cells in the bone marrow vascular niche. *Cell Rep*. 2012;2(4):964-75.

97. Bruns I, Lucas D, Pinho S, Ahmed J, Lambert MP, Kunisaki Y, et al. Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion. *Nat Med*. 2014;20(11):1315-20.

98. Franco RS. Measurement of Red Cell Lifespan and Aging. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2012;39(5):302-7.

99. Kline DL, Cliffton EE. The life span of leucocytes in the human. *Science*. 1952;115(2975):9-11.

100. Catlin SN, Busque L, Gale RE, Guttorp P, Abkowitz JL. The replication rate of human hematopoietic stem cells in vivo. *Blood*. 2011;117(17):4460-6.

101. Moore MAS. Chapter 47 - Hematopoietic Stem Cells. In: Lanza R, Langer R, Vacanti J, editors. Principles of Tissue Engineering (Fourth Edition). Boston: Academic Press; 2014. p. 989-1040.

102. Anthony B, Link DC. Regulation of Hematopoietic Stem Cells by Bone Marrow Stromal Cells. *Trends in immunology*. 2014;35(1):32-7.

103. Cao N, Yao ZX. The hemangioblast: from concept to authentication. *Anat Rec (Hoboken)*. 2011;294(4):580-8.

104. Zovein AC, Hofmann JJ, Lynch M, French WJ, Turlo KA, Yang Y, et al. Fate tracing reveals the endothelial origin of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008;3(6):625-36.

105. Lancrin C, Sroczynska P, Stephenson C, Allen T, Kouskoff V, Lacaud G. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature*. 2009;457(7231):892-5.

106. Cumano A, Godin I. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:745-85.

107. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988;241(4861):58-62.

108. Kawamoto H, Ohmura K, Katsura Y. Direct evidence for the commitment of hematopoietic stem cells to T, B and myeloid lineages in murine fetal liver. *Int Immunol*. 1997;9(7):1011-9.

109. Katsura Y, Kawamoto H. Stepwise lineage restriction of progenitors in lympho-myelopoiesis. *Int Rev Immunol*. 2001;20(1):1-20.

110. Inlay MA, Bhattacharya D, Sahoo D, Serwold T, Seita J, Karsunky H, et al. Ly6d marks the earliest stage of B-cell specification and identifies the branchpoint between B-cell and T-cell development. *Genes Dev*. 2009;23(20):2376-81.

111. Welinder E, Ahsberg J, Sigvardsson M. B-lymphocyte commitment: identifying the point of no return. *Semin Immunol*. 2011;23(5):335-40.

112. Hogan CJ, Shpall EJ, Keller G. Differential long-term and multilineage engraftment potential from subfractions of human CD34(+) cord blood cells transplanted into NOD/SCID mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(1):413-8.

113. Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of a Hierarchy of Multipotent Hematopoietic Progenitors in Human Cord Blood. *Cell stem cell*. 2007;1(6):635-45.

114. Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, Dzierzak E, Speck NA. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter. *Nature*. 2009;457(7231):887-91.

115. Yoshida T, Georgopoulos K. Ikaros fingers on lymphocyte differentiation. *Int J Hematol*. 2014;100(3):220-9.

116. Zhang P, Zhang X, Iwama A, Yu C, Smith KA, Mueller BU, et al. PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood*. 2000;96(8):2641-8.

117. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008;132(4):631-44.

118. Takizawa H, Regoes RR, Boddupalli CS, Bonhoeffer S, Manz MG. Dynamic variation in cycling of hematopoietic stem cells in steady state and inflammation. *J Exp Med*. 2011;208(2):273-84.

119. Walter D, Lier A, Geiselhart A, Thalheimer FB, Huntscha S, Sobotta MC, et al. Exit from dormancy provokes DNA-damage-induced attrition in haematopoietic stem cells. *Nature*. 2015;520(7548):549-52.

120. Shepherd BE, Guttorp P, Lansdorp PM, Abkowitz JL. Estimating human hematopoietic stem cell kinetics using granulocyte telomere lengths. *Exp Hematol*. 2004;32(11):1040-50.

121. Foudi A, Hochedlinger K, Van Buren D, Schindler JW, Jaenisch R, Carey V, et al. Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2009;27(1):84-90.

122. Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, et al. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*. 2008;135(6):1118-29.

123. Bernitz JM, Kim H-S, MacArthur B, Sieburg H, Moore K. Hematopoietic Stem Cells Count and Remember Self-Renewal Divisions. *Cell*. 2016;167(5):1296-309.e10.

124. Matsumoto A, Nakayama KI. Role of key regulators of the cell cycle in maintenance of hematopoietic stem cells. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(2):2335-44.

125. van Os R, de Haan G, Dykstra BJ. Hematopoietic stem cell quiescence: yet another role for p53. *Cell Stem Cell*. 2009;4(1):7-8.

126. Kharas MG, Lengner CJ, Al-Shahrour F, Bullinger L, Ball B, Zaidi S, et al. Musashi-2 regulates normal hematopoiesis and promotes aggressive myeloid leukemia. *Nat Med*. 2010;16(8):903-8.

127. Ito K, Carracedo A, Weiss D, Arai F, Ala U, Avigan DE, et al. A PML-PPAR-delta pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Med*. 2012;18(9):1350-8.

128. Broske AM, Vockentanz L, Kharazi S, Huska MR, Mancini E, Scheller M, et al. DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction. *Nat Genet*. 2009;41(11):1207-15.

129. Nakamura-Ishizu A, Takizawa H, Suda T. The analysis, roles and regulation of quiescence in hematopoietic stem cells. *Development*. 2014;141(24):4656-66.

130. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 2006;441(7097):1068-74.

131. Bernitz JM, Kim HS, MacArthur B, Sieburg H, Moore K. Hematopoietic Stem Cells Count and Remember Self-Renewal Divisions. *Cell*. 2016;167(5):1296-309.e10.

132. Matatall KA, Jeong M, Chen S, Sun D, Chen F, Mo Q, et al. Chronic Infection Depletes Hematopoietic Stem Cells through Stress-Induced Terminal Differentiation. *Cell Rep*. 2016;17(10):2584-95.

133. Beerman I, Bhattacharya D, Zandi S, Sigvardsson M, Weissman IL, Bryder D, et al. Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(12):5465-70.

134. Pang WW, Price EA, Sahoo D, Beerman I, Maloney WJ, Rossi DJ, et al. Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(50):20012-7.

135. Pang WW, Schrier SL, Weissman IL. Age-associated changes in human hematopoietic stem cells. *Semin Hematol*. 2017;54(1):39-42.

136. Wall DA, Wagner EL, Carter SL, Mendizabal AM, Cairo MS, Kernan NA, et al. Post-Thaw Colony Forming Unit (CFU) Counts and Yield Are the Most Important Predictors of Engraftment and Survival Following Unrelated Donor Cord Blood Transplantation (CBT): A COBLT Study Report. *Blood*. 2005;106(11):2046-.

137. Fritsch G, Buchinger P, Printz D. Use of flow cytometric CD34 analysis to quantify hematopoietic progenitor cells. *Leuk Lymphoma*. 1993;10(6):443-51.

138. Kobari L, Pflumio F, Giarratana M, Li X, Titeux M, Izac B, et al. In vitro and in vivo evidence for the long-term multilineage (myeloid, B, NK, and T) reconstitution capacity of ex vivo expanded human CD34(+) cord blood cells. *Exp Hematol*. 2000;28(12):1470-80.

139. Sarma NJ, Takeda A, Yaseen NR. Colony forming cell (CFC) assay for human hematopoietic cells. *J Vis Exp*. 2010(46).

140. Wognum B, Yuan N, Lai B, Miller CL. Colony forming cell assays for human hematopoietic progenitor cells. *Methods Mol Biol*. 2013;946:267-83.

141. Yoo KH, Lee SH, Kim HJ, Sung KW, Jung HL, Cho EJ, et al. The impact of post-thaw colony-forming units-granulocyte/macrophage on engraftment following unrelated cord blood transplantation in pediatric recipients. *Bone Marrow Transplant*. 2007;39(9):515-21.

142. Page KM, Zhang L, Mendizabal A, Wease S, Carter S, Gentry T, et al. Total colony-forming units are a strong, independent predictor of neutrophil and platelet engraftment after unrelated umbilical cord blood transplantation: a single-center analysis of 435 cord blood transplants. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(9):1362-74.

143. Gartner S, Kaplan HS. Long-term culture of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(8):4756-9.

144. Cho RH, Muller-Sieburg CE. High frequency of long-term culture-initiating cells retain in vivo repopulation and self-renewal capacity. *Exp Hematol*. 2000;28(9):1080-6.

145. Zhang XB, Li K, Fok TF, Li CK, James AE, Lam AC, et al. Cobblestone area-forming cells, long-term culture-initiating cells and NOD/SCID repopulating cells in human neonatal blood: a comparison with umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant*. 2002;30(9):557-64.

146. Denning-Kendall P, Singha S, Bradley B, Hows J. Cobblestone area-forming cells in human cord blood are heterogeneous and differ from long-term culture-initiating cells. *Stem Cells*. 2003;21(6):694-701.

147. Lapidot T. Mechanism of human stem cell migration and repopulation of NOD/SCID and B2mnull NOD/SCID mice. The role of SDF-1/CXCR4 interactions. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;938:83-95.

148. Gotoh A, Reid S, Miyazawa K, Broxmeyer HE. SDF-1 suppresses cytokine-induced adhesion of human haemopoietic progenitor cells to immobilized fibronectin. *Br J Haematol*. 1999;106(1):171-4.

149. Greiner DL, Hesselton RA, Shultz LD. SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells*. 1998;16(3):166-77.

150. Aryee KE, Shultz LD, Brehm MA. Immunodeficient mouse model for human hematopoietic stem cell engraftment and immune system development. *Methods Mol Biol*. 2014;1185:267-78.

151. Walsh N, Kenney L, Jangalwe S, Aryee K-E, Greiner DL, Brehm MA, et al. Humanized mouse models of clinical disease. *Annual review of pathology*. 2017;12:187-215.

152. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*. 2002;100(9):3175-82.

153. Christianson SW, Greiner DL, Hesselton RA, Leif JH, Wagar EJ, Schweitzer IB, et al. Enhanced human CD4+ T cell engraftment in beta2-microglobulin-deficient NOD-scid mice. *J Immunol*. 1997;158(8):3578-86.

154. Rundberg Nilsson A, Pronk CJ, Bryder D. Probing hematopoietic stem cell function using serial transplantation: Seeding characteristics and the impact of stem cell purification. *Exp Hematol*. 2015;43(9):812-7.

155. Harrison DE. Competitive repopulation: a new assay for long-term stem cell functional capacity. *Blood*. 1980;55(1):77-81.

156. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(10):3828-32.

157. Badowski MS, Harris DT. Collection, processing, and banking of umbilical cord blood stem cells for transplantation and regenerative medicine. *Methods Mol Biol*. 2012;879:279-90.

158. Solves P, Moraga R, Saucedo E, Perales A, Soler MA, Larrea L, et al. Comparison between two strategies for umbilical cord blood collection. *Bone Marrow Transplant*. 2003;31(4):269-73.

159. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, Adamson JW, Migliaccio G, Migliaccio AR, et al. Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(22):10119-22.

160. Chow R, Nademanee A, Rosenthal J, Karanes C, Jaing T-H, Graham ML, et al. Analysis of Hematopoietic Cell Transplants Using Plasma-Depleted Cord Blood Products That Are Not Red Blood Cell Reduced. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2007;13(11):1346-57.

161. Takahashi TA, Rebulla P, Armitage S, van Beckhoven J, Eichler H, Kekomaki R, et al. Multi-laboratory evaluation of procedures for reducing the volume of cord blood: influence on cell recoveries. *Cytotherapy*. 2006;8(3):254-64.

162. Pulla B, Barri YM, Anaissie E. Acute renal failure following bone marrow transplantation. *Ren Fail*. 1998;20(3):421-35.

163. Knudtzon S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood*. 1974;43(3):357-61.

164. Pelosi E, Castelli G, Testa U. Human umbilical cord is a unique and safe source of various types of stem cells suitable for treatment of hematological diseases and for regenerative medicine. *Blood Cells Mol Dis*. 2012;49(1):20-8.

165. Kotowski M, Safranow K, Kawa MP, Lewandowska J, Klos P, Dziedziejko V, et al. Circulating hematopoietic stem cell count is a valuable predictor of prematurity complications in preterm newborns. *BMC Pediatr*. 2012;12:148.

166. Oran B, Shpall E. Umbilical cord blood transplantation: a maturing technology. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:215-22.

167. Kadereit S, Mohammad SF, Miller RE, Woods KD, Listrom CD, McKinnon K, et al. Reduced NFAT1 protein expression in human umbilical cord blood T lymphocytes. *Blood*. 1999;94(9):3101-7.

168. Mehta RS, Dave H, Bollard CM, Shpall EJ. Engineering cord blood to improve engraftment after cord blood transplant. *Stem Cell Investig*. 2017;4:41.

169. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004;104(9):2752-60.

170. Baker CD, Ryan SL, Ingram DA, Seedorf GJ, Abman SH, Balasubramaniam V. Endothelial colony-forming cells from preterm infants are increased and more susceptible to hyperoxia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180(5):454-61.

171. Au P, Daheron LM, Duda DG, Cohen KS, Tyrrell JA, Lanning RM, et al. Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels. *Blood*. 2008;111(3):1302-5.

172. Lavergne M, Vanneaux V, Delmau C, Gluckman E, Rodde-Astier I, Larghero J, et al. Cord blood-circulating endothelial progenitors for treatment of vascular diseases. *Cell Prolif*. 2011;44 Suppl 1:44-7.

173. Masuda H, Asahara T. Clonogenic assay of endothelial progenitor cells. *Trends Cardiovasc Med*. 2013;23(4):99-103.

174. Estes ML, Mund JA, Mead LE, Prater DN, Cai S, Wang H, et al. Application of polychromatic flow cytometry to identify novel subsets of circulating cells with angiogenic potential. *Cytometry A*. 2010;77(9):831-9.

175. Case J, Mead LE, Bessler WK, Prater D, White HA, Saadatzadeh MR, et al. Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Exp Hematol*. 2007;35(7):1109-18.

176. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 2004;103(5):1669-75.

177. Oh W, Kim DS, Yang YS, Lee JK. Immunological properties of umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *Cell Immunol*. 2008;251(2):116-23.

178. Flynn A, Barry F, O'Brien T. UC blood-derived mesenchymal stromal cells: an overview. *Cytotherapy*. 2007;9(8):717-26.

179. Capelli C, Gotti E, Morigi M, Rota C, Weng L, Dazzi F, et al. Minimally manipulated whole human umbilical cord is a rich source of clinical-grade human mesenchymal stromal cells expanded in human platelet lysate. *Cytotherapy*. 2011;13(7):786-801.

180. Secco M, Zucconi E, Vieira NM, Fogaca LL, Cerqueira A, Carvalho MD, et al. Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood! *Stem Cells*. 2008;26(1):146-50.

181. Kim JY, Jeon HB, Yang YS, Oh W, Chang JW. Application of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in disease models. *World J Stem Cells*. 2010;2(2):34-8.

182. Damien P, Allan DS. Regenerative Therapy and Immune Modulation Using Umbilical Cord Blood–Derived Cells. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2015;21(9):1545-54.

183. Zuba-Surma EK, Klich I, Greco N, Laughlin MJ, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Optimization of isolation and further characterization of umbilical-cord-blood-derived very small embryonic/ epiblast-like stem cells (VSELs). *Eur J Haematol*. 2010;84(1):34-46.

184. Kucia M, Halasa M, Wysoczynski M, Baskiewicz-Masiuk M, Moldenhawer S, Zuba-Surma E, et al. Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood: preliminary report. *Leukemia*. 2007;21(2):297-303.

185. Ratajczak J, Zuba-Surma E, Klich I, Liu R, Wysoczynski M, Greco N, et al. Hematopoietic differentiation of umbilical cord blood-derived very small embryonic/epiblast-like stem cells. *Leukemia*. 2011;25(8):1278-85.

186. Ratajczak MZ. A novel view of the adult bone marrow stem cell hierarchy and stem cell trafficking. *Leukemia*. 2014;29:776.

187. Park B, Yoo KH, Kim C. Hematopoietic stem cell expansion and generation: the ways to make a breakthrough. *Blood research*. 2015;50(4):194-203.

188. Daikeler T, Hugle T, Farge D, Andolina M, Gualandi F, Baldomero H, et al. Allogeneic hematopoietic SCT for patients with autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44(1):27-33.

189. Ljungman P, Urbano-Ispizua A, Cavazzana-Calvo M, Demirer T, Dini G, Einsele H, et al. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: definitions and current practice in Europe. *Bone Marrow Transplant*. 2006;37(5):439-49.

190. Anasetti C. What are the most important donor and recipient factors affecting the outcome of related and unrelated allogeneic transplantation? *Best practice & research Clinical haematology*. 2008;21(4):691-7.

191. Gratwohl A, Baldomero H, Aljurf M, Pasquini MC, Bouzas LF, Yoshimi A, et al. Hematopoietic stem cell transplantation A Global Perspective. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2010;303(16):1617-24.

192. Brown JA, Boussiotis VA. Umbilical cord blood transplantation: basic biology and clinical challenges to immune reconstitution. *Clin Immunol*. 2008;127(3):286-97.

193. Pineault N, Abu-Khader A. Advances in umbilical cord blood stem cell expansion and clinical translation. *Exp Hematol*. 2015;43(7):498-513.

194. Ballen KK, Gluckman E, Broxmeyer HE. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood*. 2013;122(4):491-8.

195. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989;321(17):1174-8.

196. Beksac M. Is There Any Reason to Prefer Cord Blood Instead of Adult Donors for Hematopoietic Stem Cell Transplants? *Frontiers in Medicine*. 2015;2:95.

197. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC, et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med*. 1996;335(3):157-66.

198. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med*. 1998;339(22):1565-77.

199. Wagner JE, Rosenthal J, Sweetman R, Shu XO, Davies SM, Ramsay NK, et al. Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood*. 1996;88(3):795-802.

200. Wagner JE, Barker JN, DeFor TE, Baker KS, Blazar BR, Eide C, et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood*. 2002;100(5):1611-8.

201. Gluckman E, Rocha V, Chevret S. Results of unrelated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplant. *Transfus Clin Biol*. 2001;8(3):146-54.

202. Fernandes JF, Rocha V, Labopin M, Neven B, Moshous D, Gennery AR, et al. Transplantation in patients with SCID: mismatched related stem cells or unrelated cord blood? *Blood*. 2012;119(12):2949-55.

203. Ruggeri A, Eapen M, Scaravadou A, Cairo MS, Bhatia M, Kurtzberg J, et al. Umbilical cord blood transplantation for children with thalassemia and sickle cell disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2011;17(9):1375-82.

204. Chez M, Lepage C, Parise C, Dang-Chu A, Hankins A, Carroll M. Safety and Observations from a Placebo-Controlled, Crossover Study to Assess Use of Autologous Umbilical Cord Blood Stem Cells to Improve Symptoms in Children with Autism. *STEM CELLS Translational Medicine*. 2018;7(4):333-41.

205. Laskowitz DT, Bennett ER. Allogeneic Umbilical Cord Blood Infusion for Adults with Ischemic Stroke: Clinical Outcomes from a Phase 1 Safety Study. 2018.

206. Shalaby RH, Rashed LA, Ismaail AE, Madkour NK, Elwakeel SH. Hematopoietic stem cells derived from human umbilical cord ameliorate cisplatin-induced acute renal failure in rats. *American Journal of Stem Cells*. 2014;3(2):83-96.

207. Kotowski M, Litwinska Z, Klos P, Pius-Sadowska E, Zagrodnik-Ulan E, Ustianowski P, et al. Autologous cord blood transfusion in preterm infants - could its humoral effect be the kez to control prematurity-related complications? A preliminary study. *J Physiol Pharmacol*. 2017;68(6):921-7.

208. Liu H, Rich ES, Godley L, Odenike O, Joseph L, Marino S, et al. Reduced-intensity conditioning with combined haploidentical and cord blood transplantation results in rapid engraftment, low GVHD, and durable remissions. *Blood*. 2011;118(24):6438-45.

209. Querol S, Rubinstein P, Marsh SG, Goldman J, Madrigal JA. Cord blood banking: 'providing cord blood banking for a nation'. *Br J Haematol*. 2009;147(2):227-35.

210. Ballen KK, Barker JN, Stewart SK, Greene MF, Lane TA. Collection and preservation of cord blood for personal use. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(3):356-63.

211. Barker JN, Krepski TP, DeFor TE, Davies SM, Wagner JE, Weisdorf DJ. Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(5):257-60.

212. Remberger M, Torlen J, Ringden O, Engstrom M, Watz E, Uhlin M, et al. Effect of Total Nucleated and CD34(+) Cell Dose on Outcome after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(5):889-93.

213. Mehta RS, Rezvani K, Olson A, Oran B, Hosing C, Shah N, et al. Novel Techniques for Ex Vivo Expansion of Cord Blood: Clinical Trials. *Front Med (Lausanne)*. 2015;2:89.

214. Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, Koc ON, Rizzieri DA, Wagner JE, et al. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med*. 2001;344(24):1815-22.

215. Cohen Y, Kreiser D, Mayorov M, Nagler A. Unrelated and related cord blood banking and hematopoietic graft engineering. *Cell Tissue Bank*. 2003;4(1):29-35.

216. Koh LP. Unrelated umbilical cord blood transplantation in children and adults. *Ann Acad Med Singapore*. 2004;33(5):559-69.

217. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, McGlave PB, Miller JS, et al. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood*. 2005;105(3):1343-7.

218. Scaradavou A, Brunstein CG, Eapen M, Le-Rademacher J, Barker JN, Chao N, et al. Double unit grafts successfully extend the application of umbilical cord blood transplantation in adults with acute leukemia. *Blood*. 2013;121(5):752-8.

219. Brunstein CG, Gutman JA, Weisdorf DJ, Woolfrey AE, DeFor TE, Gooley TA, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancy: relative risks and benefits of double umbilical cord blood. *Blood*. 2010;116(22):4693-9.

220. Gutman JA, Turtle CJ, Manley TJ, Heimfeld S, Bernstein ID, Riddell SR, et al. Single-unit dominance after double-unit umbilical cord blood transplantation coincides with a specific CD8+ T-cell response against the nonengrafted unit. *Blood*. 2010;115(4):757-65.

221. Hashem H, Lazarus HM. Double umbilical cord blood transplantation: relevance of persistent mixed-unit chimerism. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;21(4):612-9.

222. MacMillan ML, Weisdorf DJ, Brunstein CG, Cao Q, DeFor TE, Verneris MR, et al. Acute graft-versus-host disease after unrelated donor umbilical cord blood transplantation: analysis of risk factors. *Blood*. 2009;113(11):2410-5.

223. Ueda T, Tsuji K, Yoshino H, Ebihara Y, Yagasaki H, Hisakawa H, et al. Expansion of human NOD/SCID-repopulating cells by stem cell factor, Flk2/Flt3 ligand, thrombopoietin, IL-6, and soluble IL-6 receptor. *J Clin Invest*. 2000;105(7):1013-21.

224. Jaroscak J, Goltry K, Smith A, Waters-Pick B, Martin PL, Driscoll TA, et al. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells: results of a phase 1 trial using the AastromReplicell System. *Blood*. 2003;101(12):5061-7.

225. Conneally E, Cashman J, Petzer A, Eaves C. Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(18):9836-41.

226. Dahlberg A, Delaney C, Bernstein ID. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 2011;117(23):6083-90.

227. Karanu FN, Murdoch B, Gallacher L, Wu DM, Koremoto M, Sakano S, et al. The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2000;192(9):1365-72.

228. Ohishi K, Varnum-Finney B, Bernstein ID. Delta-1 enhances marrow and thymus repopulating ability of human CD34(+)CD38(-) cord blood cells. *J Clin Invest*. 2002;110(8):1165-74.

229. Delaney C, Varnum-Finney B, Aoyama K, Brashem-Stein C, Bernstein ID. Dose-dependent effects of the Notch ligand Delta1 on ex vivo differentiation and in vivo marrow repopulating ability of cord blood cells. *Blood*. 2005;106(8):2693-9.

230. Goessling W, Allen RS, Guan X, Jin P, Uchida N, Dovey M, et al. Prostaglandin E2 enhances human cord blood stem cell xenotransplants and shows long-term safety in preclinical nonhuman primate transplant models. *Cell Stem Cell*. 2011;8(4):445-58.

231. Goessling W, North TE, Loewer S, Lord AM, Lee S, Stoick-Cooper CL, et al. Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. *Cell*. 2009;136(6):1136-47.

232. Zhang CC, Kaba M, Iizuka S, Huynh H, Lodish HF. Angiopoietin-like 5 and IGFBP2 stimulate ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells as assayed by NOD/SCID transplantation. *Blood*. 2008;111(7):3415-23.

233. Zheng J, Huynh H, Umikawa M, Silvany R, Zhang CC. Angiopoietin-like protein 3 supports the activity of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche. *Blood*. 2011;117(2):470-9.

234. Boitano AE, Wang J, Romeo R, Bouchez LC, Parker AE, Sutton SE, et al. Aryl Hydrocarbon Receptor Antagonists Promote the Expansion of Human Hematopoietic Stem Cells. *Science (New York, NY)*. 2010;329(5997):1345-8.

235. Singh KP, Casado FL, Opanashuk LA, Gasiewicz TA. The aryl hydrocarbon receptor has a normal function in the regulation of hematopoietic and other stem/progenitor cell populations. *Biochem Pharmacol*. 2009;77(4):577-87.

236. Wagner JE, Jr., Brunstein CG, Boitano AE, DeFor TE, McKenna D, Sumstad D, et al. Phase I/II Trial of StemRegenin-1 Expanded Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells Supports Testing as a Stand-Alone Graft. *Cell Stem Cell*. 2016;18(1):144-55.

237. Zou J, Zou P, Wang J, Li L, Wang Y, Zhou D, et al. Inhibition of p38 MAPK activity promotes ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells. *Ann Hematol*. 2012;91(6):813-23.

238. Sudipto B, Qixing Z, Xiubo F, Zhiyong P, Tiong LAS, Hui LT, et al. Ex Vivo Expansion of CD34+CD90+CD49f+ Hematopoietic Stem and Progenitor Cells from Non-Enriched Umbilical Cord Blood with Azole Compounds. *STEM CELLS Translational Medicine*. 2018;7(5):376-93.

239. Horwitz ME, Chao NJ, Rizzieri DA, Long GD, Sullivan KM, Gasparetto C, et al. Umbilical cord blood expansion with nicotinamide provides long-term multilineage engraftment. *J Clin Invest*. 2014;124(7):3121-8.

240. Anand S, Thomas S, Hyslop T, Adcock J, Corbet K, Gasparetto C, et al. Transplantation of Ex Vivo Expanded Umbilical Cord Blood (NiCord) Decreases Early Infection and Hospitalization. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23(7):1151-7.

241. Peled T, Shoham H, Aschengrau D, Yackoubov D, Frei G, Rosenheimer GN, et al. Nicotinamide, a SIRT1 inhibitor, inhibits differentiation and facilitates expansion of hematopoietic progenitor cells with enhanced bone marrow homing and engraftment. *Exp Hematol*. 2012;40(4):342-55.e1.

242. Iancu-Rubin C, Hoffman R. Role of epigenetic reprogramming in hematopoietic stem cell function. *Curr Opin Hematol*. 2015;22(4):279-85.

243. De Felice L, Tatarelli C, Mascolo MG, Gregorj C, Agostini F, Fiorini R, et al. Histone deacetylase inhibitor valproic acid enhances the cytokine-induced expansion of human hematopoietic stem cells. *Cancer Res*. 2005;65(4):1505-13.

244. Milhem M, Mahmud N, Lavelle D, Araki H, DeSimone J, Saunthararajah Y, et al. Modification of hematopoietic stem cell fate by 5aza 2'deoxycytidine and trichostatin A. *Blood*. 2004;103(11):4102-10.

245. Araki H, Mahmud N, Milhem M, Nunez R, Xu M, Beam CA, et al. Expansion of human umbilical cord blood SCID-repopulating cells using chromatin-modifying agents. *Exp Hematol*. 2006;34(2):140-9.

246. Araki H, Yoshinaga K, Boccuni P, Zhao Y, Hoffman R, Mahmud N. Chromatin-modifying agents permit human hematopoietic stem cells to undergo multiple cell divisions while retaining their repopulating potential. *Blood*. 2007;109(8):3570-8.

247. Peled T, Landau E, Prus E, Treves AJ, Nagler A, Fibach E. Cellular copper content modulates differentiation and self-renewal in cultures of cord blood-derived CD34+ cells. *Br J Haematol*. 2002;116(3):655-61.

248. Peled T, Glukhman E, Hasson N, Adi S, Assor H, Yudin D, et al. Chelatable cellular copper modulates differentiation and self-renewal of cord blood-derived hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*. 2005;33(10):1092-100.

249. Peled T, Mandel J, Goudsmid RN, Landor C, Hasson N, Harati D, et al. Pre-clinical development of cord blood-derived progenitor cell graft expanded ex vivo with cytokines and the polyamine copper chelator tetraethylenepentamine. *Cytotherapy*. 2004;6(4):344-55.

250. de Lima M, McMannis J, Gee A, Komanduri K, Couriel D, Andersson BS, et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. *Bone Marrow Transplant*. 2008;41(9):771-8.

251. de Lima M, McNiece I, Robinson SN, Munsell M, Eapen M, Horowitz M, et al. Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture. *N Engl J Med*. 2012;367(24):2305-15.

252. Ratajczak MZ. Phenotypic and functional characterization of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol*. 2008;15(4):293-300.

253. Weidner CI, Walenda T, Lin Q, Wolfler MM, Denecke B, Costa IG, et al. Hematopoietic stem and progenitor cells acquire distinct DNA-hypermethylation during in vitro culture. *Sci Rep*. 2013;3:3372.

254. Delaney C, Heimfeld S, Brashem-Stein C, Voorhies H, Manger RL, Bernstein ID. Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat Med*. 2010;16(2):232-6.

255. Christopherson KW, 2nd, Hangoc G, Broxmeyer HE. Cell surface peptidase CD26/dipeptidylpeptidase IV regulates CXCL12/stromal cell-derived factor-1 alpha-mediated chemotaxis of human cord blood CD34+ progenitor cells. *J Immunol*. 2002;169(12):7000-8.

256. Christopherson KW, 2nd, Hangoc G, Mantel CR, Broxmeyer HE. Modulation of hematopoietic stem cell homing and engraftment by CD26. *Science*. 2004;305(5686):1000-3.

257. Farag SS, Srivastava S, Messina-Graham S, Schwartz J, Robertson MJ, Abonour R, et al. In vivo DPP-4 inhibition to enhance engraftment of single-unit cord blood transplants in adults with hematological malignancies. *Stem Cells Dev*. 2013;22(7):1007-15.

258. Hoggatt J, Singh P, Sampath J, Pelus LM. Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation. *Blood*. 2009;113(22):5444-55.

259. Peled A, Adi S, Peleg I. Nocotinamide modulates ex vivo expansion of cord blood-derived CD34+ cells cultured with cytokines and promotes their homing and engraftment in SCID mice2006.

260. Guo B, Huang X, Broxmeyer HE. Enhancing human cord blood hematopoietic stem cell engraftment by targeting nuclear hormone receptors. *Curr Opin Hematol*. 2018;25(4):245-52.

261. Guo B, Huang X, Lee MR, Lee SA, Broxmeyer HE. Antagonism of PPAR-gamma signaling expands human hematopoietic stem and progenitor cells by enhancing glycolysis. *Nat Med*. 2018;24(3):360-7.

262. Robinson SN, Simmons PJ, Thomas MW, Brouard N, Javni JA, Trilok S, et al. Ex vivo fucosylation improves human cord blood engraftment in NOD-SCID IL-2Rgamma(null) mice. *Exp Hematol*. 2012;40(6):445-56.

263. Wan X, Sato H, Miyaji H, McDaniel JM, Wang Y, Kaneko E, et al. Fucosyltransferase VII improves the function of selectin ligands on cord blood hematopoietic stem cells. *Glycobiology*. 2013;23(10):1184-91.

264. Barker JN, Scaradavou A, Stevens CE. Combined effect of total nucleated cell dose and HLA match on transplantation outcome in 1061 cord blood recipients with hematologic malignancies. *Blood*. 2010;115(9):1843-9.

265. Lemarie C, Esterni B, Calmels B, Dazey B, Lapierre V, Lecchi L, et al. CD34(+) progenitors are reproducibly recovered in thawed umbilical grafts, and positively influence haematopoietic reconstitution after transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2007;39(8):453-60.

266. Migliaccio AR, Adamson JW, Stevens CE, Dobrila NL, Carrier CM, Rubinstein P. Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood*. 2000;96(8):2717-22.

267. Terakura S, Azuma E, Murata M, Kumamoto T, Hirayama M, Atsuta Y, et al. Hematopoietic engraftment in recipients of unrelated donor umbilical cord blood is affected by the CD34+ and CD8+ cell doses. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007;13(7):822-30.

268. Page KM, Zhang L, Mendizabal A, Wease S, Carter S, Shoulars K, et al. The Cord Blood Apgar: a novel scoring system to optimize selection of banked cord blood grafts for transplantation. *Transfusion*. 2012;52(2):272-83.

269. Ooi J, Takahashi S, Tomonari A, Tsukada N, Konuma T, Kato S, et al. Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning in adults with acute myelogenous leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(12):1341-7.

270. Ooi J. Cord blood transplantation in adults. *Bone Marrow Transplant*. 2009;44(10):661-6.

271. Sedgwick AE, D'Souza-Schorey C. The Biology of Extracellular Microvesicles. 2018.

272. Ludwig AK, Giebel B. Exosomes: small vesicles participating in intercellular communication. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(1):11-5.

273. Foster BP, Balassa T, Benen TD, Dominovic M, Elmadjian GK, Florova V, et al. Extracellular vesicles in blood, milk and body fluids of the female and male urogenital tract and with special regard to reproduction. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2016;53(6):379-95.

274. Balbi C, Piccoli M, Barile L, Papait A, Armirotti A, Principi E, et al. First Characterization of Human Amniotic Fluid Stem Cell Extracellular Vesicles as a Powerful Paracrine Tool Endowed with Regenerative Potential. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(5):1340-55.

275. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013;200(4):373-83.

276. Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borras FE, Buzas EI, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles*. 2015;4:27066.

277. Thery C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi-Castagnoli P, et al. Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol*. 1999;147(3):599-610.

278. Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol*. 2009;19(2):43-51.

279. Thery C, Boussac M, Veron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, et al. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol*. 2001;166(12):7309-18.

280. Zaborowski MP, Balaj L, Breakefield XO, Lai CP. Extracellular Vesicles: Composition, Biological Relevance, and Methods of Study. *Bioscience*. 2015;65(8):783-97.

281. Minciacchi VR, You S, Spinelli C, Morley S, Zandian M, Aspuria PJ, 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.

282. Minciacchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;40:41-51.

283. Montecalvo A, Larregina AT, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan ML, Karlsson JM, et al. Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*. 2012;119(3):756-66.

284. Harting MT, Srivastava AK, Zhaorigetu S, Bair H, Prabhakara KS, Toledano Furman NE, et al. Inflammation-Stimulated Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Attenuate Inflammation. 2018;36(1):79-90.

285. Laulagnier K, Motta C, Hamdi S, Roy S, Fauvelle F, Pageaux JF, et al. Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *Biochem J*. 2004;380:161-71.

286. 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.

287. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*. 2008;319(5867):1244-7.

288. van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J Biochem*. 2006;140(1):13-21.

289. Hemler ME. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003;19:397-422.

290. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6):654-9.

291. Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, et al. Detection of microRNA Expression in Human Peripheral Blood Microvesicles. *PLoS ONE*. 2008;3(11):e3694.

292. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, et al. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*. 2008;10(12):1470-6.

293. Ratajczak MZ, Ratajczak J. Horizontal transfer of RNA and proteins between cells by extracellular microvesicles: 14 years later. *Clin Transl Med*. 2016;5(1):7.

294. Michael A, Bajracharya SD, Yuen PS, Zhou H, Star RA, Illei GG, et al. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Dis*. 2010;16(1):34-8.

295. Mittelbrunn M, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, Gonzalez S, Sanchez-Cabo F, Gonzalez MA, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun*. 2011;2:282.

296. Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, Kim DJ, Hearn SA, Danforth D, et al. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS One*. 2010;5(10):e13515.

297. Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci*. 2012;37(11):460-5.

298. Gibbings DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol*. 2009;11(9):1143-9.

299. Nolte-'t Hoen EN, Buermans HP, Waasdorp M, Stoorvogel W, Wauben MH, t Hoen PA. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(18):9272-85.

300. Vojtech L, Woo S, Hughes S, Levy C, Ballweber L, Sauteraud RP, et al. Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(11):7290-304.

301. Muraca M, Piccoli M, Franzin C, Tolomeo AM, Jurga M, Pozzobon M, et al. Diverging Concepts and Novel Perspectives in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci*. 2017;18(5).

302. Cai J, Han Y, Ren H, Chen C, He D, Zhou L, et al. Extracellular vesicle-mediated transfer of donor genomic DNA to recipient cells is a novel mechanism for genetic influence between cells. *J Mol Cell Biol*. 2013;5(4):227-38.

303. Waldenstrom A, Genneback N, Hellman U, Ronquist G. Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *PLoS One*. 2012;7(4):e34653.

304. Lee TH, Chennakrishnaiah S, Audemard E, Montermini L, Meehan B, Rak J. Oncogenic ras-driven cancer cell vesiculation leads to emission of double-stranded DNA capable of interacting with target cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;451(2):295-301.

305. Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho YJ, Pomeroy SL, Breakefield XO, et al. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun*. 2011;2:180.

306. Guescini M, Guidolin D, Vallorani L, Casadei L, Gioacchini AM, Tibollo P, et al. C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction. *Exp Cell Res*. 2010;316(12):1977-84.

307. Guescini M, Genedani S, Stocchi V, Agnati LF. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *J Neural Transm (Vienna)*. 2010;117(1):1-4.

308. Lazaro-Ibanez E, Sanz-Garcia A, Visakorpi T, Escobedo-Lucea C, Siljander P, Ayuso-Sacido A, et al. Different gDNA content in the subpopulations of prostate cancer extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes. *Prostate*. 2014;74(14):1379-90.

309. Cai J, Guan W, Tan X, Chen C, Li L, Wang N, et al. SRY gene transferred by extracellular vesicles accelerates atherosclerosis by promotion of leucocyte adherence to endothelial cells. *Clin Sci (Lond)*. 2015;129(3):259-69.

310. Mobius W, Ohno-Iwashita Y, van Donselaar EG, Oorschot VM, Shimada Y, Fujimoto T, et al. Immunoelectron microscopic localization of cholesterol using biotinylated and non-cytolytic perfringolysin O. *J Histochem Cytochem*. 2002;50(1):43-55.

311. White IJ, Bailey LM, Aghakhani MR, Moss SE, Futter CE. EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. *Embo j*. 2006;25(1):1-12.

312. Raiborg C, Stenmark H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature*. 2009;458(7237):445-52.

313. Baietti MF, Zhang Z, Mortier E, Melchior A, Degeest G, Geeraerts A, et al. Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nat Cell Biol*. 2012;14(7):677-85.

314. Marsh M, van Meer G. Cell biology. No ESCRTs for exosomes. *Science*. 2008;319(5867):1191-2.

315. Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, Brech A. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*. 2009;10(7):925-37.

316. Shen B, Fang Y, Wu N, Gould SJ. Biogenesis of the posterior pole is mediated by the exosome/microvesicle protein-sorting pathway. *J Biol Chem*. 2011;286(51):44162-76.

317. Shen B, Wu N, Yang JM, Gould SJ. Protein targeting to exosomes/microvesicles by plasma membrane anchors. *J Biol Chem*. 2011;286(16):14383-95.

318. Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G, et al. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol*. 2009;19(22):1875-85.

319. Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S. Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell*. 2007;12(5):671-82.

320. Brown FC, Pfeffer SR. An update on transport vesicle tethering. *Mol Membr Biol*. 2010;27(8):457-61.

321. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, et al. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat Cell Biol*. 2010;12(1):19-30; sup pp 1-13.

322. Lachenal G, Pernet-Gallay K, Chivet M, Hemming FJ, Belly A, Bodon G, et al. Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Mol Cell Neurosci*. 2011;46(2):409-18.

323. Heijnen HF, Schiel AE, Fijnheer R, Geuze HJ, Sixma JJ. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood*. 1999;94(11):3791-9.

324. Savina A, Furlan M, Vidal M, Colombo MI. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem*. 2003;278(22):20083-90.

325. Obregon C, Rothen-Rutishauser B, Gitahi SK, Gehr P, Nicod LP. Exovesicles from human activated dendritic cells fuse with resting dendritic cells, allowing them to present alloantigens. *Am J Pathol*. 2006;169(6):2127-36.

326. Momen-Heravi F. Isolation of Extracellular Vesicles by Ultracentrifugation. *Methods Mol Biol*. 2017;1660:25-32.

327. Momen-Heravi F, Balaj L, Alian S, Mantel PY, Halleck AE, Trachtenberg AJ, et al. Current methods for the isolation of extracellular vesicles. *Biol Chem*. 2013;394(10):1253-62.

328. Szatanek R, Baran J, Siedlar M, Baj-Krzyworzeka M. Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach (Review). *Int J Mol Med*. 2015;36(1):11-7.

329. Furi I, Momen-Heravi F, Szabo G. Extracellular vesicle isolation: present and future. *Annals of Translational Medicine*. 2017;5(12):263.

330. Chaput N, Théry C. Exosomes: immune properties and potential clinical implementations. *Seminars in Immunopathology*. 2011;33(5):419-40.

331. Gallart-Palau X, Serra A, Wong AS, Sandin S, Lai MK, Chen CP, et al. Extracellular vesicles are rapidly purified from human plasma by PRotein Organic Solvent PRecipitation (PROSPR). *Sci Rep*. 2015;5:14664.

332. Deregibus MC, Figliolini F, D'Antico S, Manzini PM, Pasquino C, De Lena M, et al. Charge-based precipitation of extracellular vesicles. *Int J Mol Med*. 2016;38(5):1359-66.

333. Xu R, Greening DW, Zhu H-J, Takahashi N, Simpson RJ. Extracellular vesicle isolation and characterization: toward clinical application. *The Journal of Clinical Investigation*. 2016;126(4):1152-62.

334. Clayton A, Court J, Navabi H, Adams M, Mason MD, Hobot JA, et al. Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. *J Immunol Methods*. 2001;247(1-2):163-74.

335. Oksvold MP, Neurauter A, Pedersen KW. Magnetic bead-based isolation of exosomes. *Methods Mol Biol*. 2015;1218:465-81.

336. Prada I, Meldolesi J. Binding and Fusion of Extracellular Vesicles to the Plasma Membrane of Their Cell Targets. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(8):1296.

337. Gasser O, Hess C, Miot S, Deon C, Sanchez JC, Schifferli JA. Characterisation and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Exp Cell Res*. 2003;285(2):243-57.

338. Chivet M, Javalet C, Laulagnier K, Blot B, Hemming FJ, Sadoul R. Exosomes secreted by cortical neurons upon glutamatergic synapse activation specifically interact with neurons. *J Extracell Vesicles*. 2014;3:24722.

339. Rana S, Yue S, Stadel D, Zoller M. Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012;44(9):1574-84.

340. Viñas JL, Spence M, Gutsol A, Knoll W, Burger D, Zimpelmann J, et al. Receptor-Ligand Interaction Mediates Targeting of Endothelial Colony Forming Cell-derived Exosomes to the Kidney after Ischemic Injury. *Scientific reports*. 2018;8(1):16320-.

341. Denzer K, van Eijk M, Kleijmeer MJ, Jakobson E, de Groot C, Geuze HJ. Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. *J Immunol*. 2000;165(3):1259-65.

342. Tian T, Wang Y, Wang H, Zhu Z, Xiao Z. Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *J Cell Biochem*. 2010;111(2):488-96.

343. Robbins PD, Morelli AE. Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(3):195-208.

344. Segura E, Amigorena S, Thery C. Mature dendritic cells secrete exosomes with strong ability to induce antigen-specific effector immune responses. *Blood Cells Mol Dis*. 2005;35(2):89-93.

345. Zhang H, Xie Y, Li W, Chibbar R, Xiong S, Xiang J. CD4(+) T cell-released exosomes inhibit CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte responses and antitumor immunity. *Cellular and Molecular Immunology*. 2011;8(1):23-30.

346. Martinez-Lorenzo MJ, Anel A, Gamen S, Monle n I, Lasierra P, Larrad L, et al. Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J Immunol*. 1999;163(3):1274-81.

347. Martinez-Lorenzo MJ, Anel A, Alava MA, Pineiro A, Naval J, Lasierra P, et al. The human melanoma cell line MelJuSo secretes bioactive FasL and APO2L/TRAIL on the surface of microvesicles. Possible contribution to tumor counterattack. *Exp Cell Res*. 2004;295(2):315-29.

348. Yao Y, Wang C, Wei W, Shen C, Deng X, Chen L, et al. Dendritic cells pulsed with leukemia cell-derived exosomes more efficiently induce antileukemic immunities. *PLoS One*. 2014;9(3):e91463.

349. Segura E, Nicco C, Lombard B, Veron P, Raposo G, Batteux F, et al. ICAM-1 on exosomes from mature dendritic cells is critical for efficient naive T-cell priming. *Blood*. 2005;106(1):216-23.

350. Zhang HG, Grizzle WE. Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression. *Clin Cancer Res*. 2011;17(5):959-64.

351. Filipazzi P, Burdek M, Villa A, Rivoltini L, Huber V. Recent advances on the role of tumor exosomes in immunosuppression and disease progression. *Semin Cancer Biol*. 2012;22(4):342-9.

352. Litwinska Z, Luczkowska K, Machalinski B. Extracellular vesicles in hematological malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2019;60(1):29-36.

353. Prado N, Marazuela EG, Segura E, Fernandez-Garcia H, Villalba M, Thery C, et al. Exosomes from bronchoalveolar fluid of tolerized mice prevent allergic reaction. *J Immunol*. 2008;181(2):1519-25.

354. Van Niel G, Mallegol J, Bevilacqua C, Candalh C, Brugiere S, Tomaskovic-Crook E, et al. Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut*. 2003;52(12):1690-7.

355. Admyre C, Johansson SM, Qazi KR, Filen JJ, Lahesmaa R, Norman M, et al. Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol*. 2007;179(3):1969-78.

356. Gross JC, Chaudhary V, Bartscherer K, Boutros M. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nat Cell Biol*. 2012;14(10):1036-45.

357. Sheldon H, Heikamp E, Turley H, Dragovic R, Thomas P, Oon CE, et al. New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes. *Blood*. 2010;116(13):2385-94.

358. Bakhti M, Winter C, Simons M. Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles. *J Biol Chem*. 2011;286(1):787-96.

359. Wang S, Cesca F, Loers G, Schweizer M, Buck F, Benfenati F, et al. Synapsin I is an oligomannose-carrying glycoprotein, acts as an oligomannose-binding lectin, and promotes neurite outgrowth and neuronal survival when released via glia-derived exosomes. *J Neurosci*. 2011;31(20):7275-90.

360. Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, et al. Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(26):9683-8.

361. Emmanouilidou E, Melachroinou K, Roumeliotis T, Garbis SD, Ntzouni M, Margaritis LH, et al. Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J Neurosci*. 2010;30(20):6838-51.

362. Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P, et al. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(30):11172-7.

363. Sousa D, Lima RT, Vasconcelos MH. Intercellular Transfer of Cancer Drug Resistance Traits by Extracellular Vesicles. *Trends Mol Med*. 2015;21(10):595-608.

364. Bouvy C, Wannez A, Laloy J, Chatelain C, Dogne JM. Transfer of multidrug resistance among acute myeloid leukemia cells via extracellular vesicles and their microRNA cargo. *Leuk Res*. 2017;62:70-6.

365. Wesolowska A, Piwocka K. [Exosomal microRNAs as a part of the cell-cell communication in cancer]. *Postepy Biochem*. 2017;63(2):110-8.

366. Ohno S, Drummen GP, Kuroda M. Focus on Extracellular Vesicles: Development of Extracellular Vesicle-Based Therapeutic Systems. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2):172.

367. Fuhrmann G, Serio A, Mazo M, Nair R, Stevens MM. Active loading into extracellular vesicles significantly improves the cellular uptake and photodynamic effect of porphyrins. *J Control Release*. 2015;205:35-44.

368. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhal S, Wood MJA. Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology*. 2011;29:341.

369. Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics*. 2009;6(3):267-83.

370. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2008;110(1):13-21.

371. Xu Y, Qin S, An T, Tang Y, Huang Y, Zheng L. MiR-145 detection in urinary extracellular vesicles increase diagnostic efficiency of prostate cancer based on hydrostatic filtration dialysis method. *Prostate*. 2017;77(10):1167-75.

372. La Marca V, Fierabracci A. Insights into the Diagnostic Potential of Extracellular Vesicles and Their miRNA Signature from Liquid Biopsy as Early Biomarkers of Diabetic Micro/Macrovascular Complications. 2017;18(9).

373. Damo M, Wilson DS, Simeoni E, Hubbell JA. TLR-3 stimulation improves anti-tumor immunity elicited by dendritic cell exosome-based vaccines in a murine model of melanoma. *Sci Rep*. 2015;5:17622.

374. Hao S, Moyana T, Xiang J. Review: cancer immunotherapy by exosome-based vaccines. *Cancer Biother Radiopharm*. 2007;22(5):692-703.

375. Baraniak PR, McDevitt TC. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regen Med*. 2010;5(1):121-43.

376. Zhang B, Yeo RWY, Tan KH, Lim SK. Focus on Extracellular Vesicles: Therapeutic Potential of Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(2):174.

377. Rani S, Ryan AE, Griffin MD, Ritter T. Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. *Mol Ther*. 2015;23(5):812-23.

378. Li H, Meng X, Liang X, Gao Y, Cai S. Administration of microparticles from blood of the lipopolysaccharide-treated rats serves to induce pathologic changes of acute respiratory distress syndrome. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2015;240(12):1735-41.

379. Zhu YG, Feng XM, Abbott J, Fang XH, 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.

380. Haney MJ, Klyachko NL, Zhao Y, Gupta R, Plotnikova EG, He Z, et al. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *J Control Release*. 2015;207:18-30.

381. Kilpinen L, Impola U, Sankkila L, Ritamo I, Aatonen M, Kilpinen S, et al. Extracellular membrane vesicles from umbilical cord blood-derived MSC protect against ischemic acute kidney injury, a feature that is lost after inflammatory conditioning. *J Extracell Vesicles*. 2013;2.

382. Gatti S, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Cantaluppi V, Tetta C, et al. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(5):1474-83.

383. Zhou Y, Xu H, Xu W, Wang B, Wu H, Tao Y, et al. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(2):34.

384. 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.

385. Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NS, Choo A, Chen TS, et al. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res*. 2010;4(3):214-22.

386. 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.

387. Zhang HC, Liu XB, Huang S, Bi XY, Wang HX, Xie LX, et al. Microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells stimulated by hypoxia promote angiogenesis both in vitro and in vivo. *Stem Cells Dev*. 2012;21(18):3289-97.

388. Lee C, Mitsialis SA, Aslam M, Vitali SH, Vergadi E, Konstantinou G, et al. Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 2012;126(22):2601-11.

389. Yang J, Liu XX, Fan H, Tang Q, Shou ZX, Zuo DM, et al. Extracellular Vesicles Derived from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Protect against Experimental Colitis via Attenuating Colon Inflammation, Oxidative Stress and Apoptosis. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140551.

390. Ophelders DR, Wolfs TG, Jellema RK, Zwanenburg A, Andriessen P, Delhaas T, et al. Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Protect the Fetal Brain After Hypoxia-Ischemia. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(6):754-63.

391. Khan M, Nickoloff E, Abramova T, Johnson J, Verma SK, Krishnamurthy P, et al. Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction. *Circ Res*. 2015;117(1):52-64.

392. Gazdhar A, Grad I, Tamo L, Gugger M, Feki A, Geiser T. The secretome of induced pluripotent stem cells reduces lung fibrosis in part by hepatocyte growth factor. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(6):123.

393. Oh M, Lee J, Kim YJ, Rhee WJ, Park JH. Exosomes Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells Ameliorate the Aging of Skin Fibroblasts. 2018;19(6).

394. Wang Y, Zhang L, Li Y, Chen L, Wang X, Guo W, et al. Exosomes/microvesicles from induced pluripotent stem cells deliver cardioprotective miRNAs and prevent cardiomyocyte apoptosis in the ischemic myocardium. *Int J Cardiol*. 2015;192:61-9.

395. 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*. 2018;122(2):296-309.

396. 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.

397. Hu GW, Li Q, Niu X, Hu B, Liu J, Zhou SM, et al. Exosomes secreted by human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells attenuate limb ischemia by promoting angiogenesis in mice. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:10.

398. Zhang J, Guan J, Niu X, Hu G, Guo S, Li Q, et al. Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis. *J Transl Med*. 2015;13:49.

399. Qi X, Zhang J, Yuan H, Xu Z, Li Q, Niu X, et al. Exosomes Secreted by Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells Repair Critical-Sized Bone Defects through Enhanced Angiogenesis and Osteogenesis in Osteoporotic Rats. *Int J Biol Sci*. 2016;12(7):836-49.

400. Kordelas L, Rebmann V, Ludwig AK, Radtke S, Ruesing J, Doeppner TR, et al. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia*. 2014;28(4):970-3.

401. Day RN, Davidson MW. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging. *Chemical Society reviews*. 2009;38(10):2887-921.

402. 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 (Berl)*. 2017;95(2):205-20.

403. Filipe V, Hawe A, Jiskoot W. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharm Res*. 2010;27(5):796-810.

404. Gross J, Sayle S, Karow AR, Bakowsky U, Garidel P. Nanoparticle tracking analysis of particle size and concentration detection in suspensions of polymer and protein samples: Influence of experimental and data evaluation parameters. *Eur J Pharm Biopharm*. 2016;104:30-41.

405. 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.

406. Chandler WL, Yeung W, Tait JF. A new microparticle size calibration standard for use in measuring smaller microparticles using a new flow cytometer. *J Thromb Haemost*. 2011;9(6):1216-24.

407. Crouch SP, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods*. 1993;160(1):81-8.

408. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994;84(5):1415-20.

409. Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry*. 1992;13(2):204-8.

410. Paredes RM, Etzler JC, Watts LT, Zheng W, Lechleiter JD. Chemical calcium indicators. *Methods*. 2008;46(3):143-51.

411. Braut-Boucher F, Pichon J, Rat P, Adolphe M, Aubery M, Font J. A non-isotopic, highly sensitive, fluorimetric, cell-cell adhesion microplate assay using calcein AM-labeled lymphocytes. *J Immunol Methods*. 1995;178(1):41-51.

412. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.

413. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(2):118-30.

414. Garcia S, Freitas AA. Humanized mice: current states and perspectives. *Immunol Lett*. 2012;146(1-2):1-7.

415. Iseki A, Morita Y, Nakauchi H, Ema H. Hematopoietic Stem Cells in the Mouse Spleen. *Blood*. 2008;112(11):2421.

416. Lotvall J, Hill AF, Hochberg F, Buzas EI, Di Vizio D, 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;3:26913.

417. Muller-Taubenberger A, Lupas AN, Li H, Ecke M, Simmeth E, Gerisch G. Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis. *Embo j*. 2001;20(23):6772-82.

418. Willms E, Johansson HJ, Mager I, Lee Y, Blomberg KE, Sadik M, et al. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Sci Rep*. 2016;6:22519.

419. Baumert B, Grymula K, Pietruszka D, Kotowski M, Mielczarek M, Dziedziejko V, et al. An optimization of hematopoietic stem and progenitor cell isolation for scientific and clinical

purposes by the application of a new parameter determining the hematopoietic graft efficacy. *Folia Histochem Cytobiol*. 2008;46(3):299-305.

420. Laredo J, Demur C, Muller C, Saivin S, Cassar G, Bousquet C, et al. Effects of H-7 and staurosporine on proliferation and self-renewal of acute myeloid leukemia progenitors. *Leukemia*. 1993;7(6):813-20.

421. Ruegg UT, Burgess GM. Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol Sci*. 1989;10(6):218-20.

422. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood*. 2005;106(6):1901-10.

423. Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med*. 1997;185(1):111-20.

424. Driessen RL, Johnston HM, Nilsson SK. Membrane-bound stem cell factor is a key regulator in the initial lodgment of stem cells within the endosteal marrow region. *Exp Hematol*. 2003;31(12):1284-91.

425. Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*. 2002;115(20):3861-3.

426. Papayannopoulou T, Craddock C. Homing and trafficking of hemopoietic progenitor cells. *Acta Haematol*. 1997;97(1-2):97-104.

427. van der Loo JC, Xiao X, McMillin D, Hashino K, Kato I, Williams DA. VLA-5 is expressed by mouse and human long-term repopulating hematopoietic cells and mediates adhesion to extracellular matrix protein fibronectin. *Journal of Clinical Investigation*. 1998;102(5):1051-61.

428. 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.

429. De Luca L, Trino S, Laurenzana I, Simeon V, Calice G, Raimondo S, et al. MiRNAs and piRNAs from bone marrow mesenchymal stem cell extracellular vesicles induce cell survival and inhibit cell differentiation of cord blood hematopoietic stem cells: a new insight in transplantation. *Oncotarget*. 2016;7(6):6676-92.

430. Oshima M, Endoh M, Endo TA, Toyoda T, Nakajima-Takagi Y, Sugiyama F, et al. Genome-wide analysis of target genes regulated by HoxB4 in hematopoietic stem and progenitor cells developing from embryonic stem cells. *Blood*. 2011;117(15):e142-e50.

431. Hall MA, Curtis DJ, Metcalf D, Elefanty AG, Sourris K, Robb L, et al. The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S12. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(3):992-7.

432. Belka C, Budach W. Anti-apoptotic Bcl-2 proteins: structure, function and relevance for radiation biology. *Int J Radiat Biol*. 2002;78(8):643-58.

433. Medvedovic J, Ebert A, Tagoh H, Busslinger M. Pax5: a master regulator of B cell development and leukemogenesis. *Adv Immunol*. 2011;111:179-206.

434. Liu J, Sato C, Cerletti M, Wagers A. Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Curr Top Dev Biol*. 2010;92:367-409.

435. Mollicone R, Moore SE, Bovin N, Garcia-Rosasco M, Candelier JJ, Martinez-Duncker I, et al. Activity, splice variants, conserved peptide motifs, and phylogeny of two new alpha1,3-fucosyltransferase families (FUT10 and FUT11). *J Biol Chem*. 2009;284(7):4723-38.

436. Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*. 2007;26(37):5541-52.

437. Ichikawa M, Yoshimi A, Nakagawa M, Nishimoto N, Watanabe-Okochi N, Kurokawa M. A role for RUNX1 in hematopoiesis and myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 2013;97(6):726-34.

438. Ohneda K, Yamamoto M. Roles of hematopoietic transcription factors GATA-1 and GATA-2 in the development of red blood cell lineage. *Acta Haematol*. 2002;108(4):237-45.

439. Tsou C-L, Gladue RP, Carroll LA, Paradis T, Boyd JG, Nelson RT, et al. Identification of C-C Chemokine Receptor 1 (CCR1) as the Monocyte Hemofiltrate C-C Chemokine (HCC)-1 Receptor. *The Journal of Experimental Medicine*. 1998;188(3):603.

440. Ardito F, Giuliani M, Perrone D, Troiano G, Muzio LL. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. 2017;40(2):271-80.

441. Rane SG, Reddy EP. JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene*. 2002;21(21):3334-58.

442. Schuringa JJ, Chung KY, Morrone G, Moore MA. Constitutive activation of STAT5A promotes human hematopoietic stem cell self-renewal and erythroid differentiation. *J Exp Med*. 2004;200(5):623-35.

443. Huang J, Zhang Y, Bersenev A, O'Brien WT, Tong W, Emerson SG, et al. Pivotal role for glycogen synthase kinase-3 in hematopoietic stem cell homeostasis in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(12):3519-29.

444. McCubrey JA, Steelman LS, Bertrand FE, Davis NM, Abrams SL, Montalto G, et al. Multifaceted roles of GSK-3 and Wnt/β-catenin in hematopoiesis and leukemogenesis: opportunities for therapeutic intervention. *Leukemia*. 2014;28(1):15-33.

445. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005;307(5712):1098-101.

446. Gao C, Xiao G, Hu J. Regulation of Wnt/β-catenin signaling by posttranslational modifications. *Cell & Bioscience*. 2014;4:13-.

447. Kirstetter P, Anderson K, Porse BT, Jacobsen SE, Nerlov C. Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat Immunol*. 2006;7(10):1048-56.

448. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2008;30(2):214-26.

449. Sanz P. AMP-activated protein kinase: structure and regulation. *Curr Protein Pept Sci*. 2008;9(5):478-92.

450. Louria-Hayon I. Signal, transduction, and the hematopoietic stem cell. *Rambam Maimonides Med J*. 2014;5(4):e0033.

451. Hanks SK, Polte TR. Signaling through focal adhesion kinase. *Bioessays*. 1997;19(2):137-45.

452. Rodrigues GA, Falasca M, Zhang Z, Ong SH, Schlessinger J. A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling. *Mol Cell Biol*. 2000;20(4):1448-59.

453. Armitage JO. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1994;330(12):827-38.

454. Rizk M, Aziz J, Shorr R, Allan DS. Cell-Based Therapy Using Umbilical Cord Blood for Novel Indications in Regenerative Therapy and Immune Modulation: An Updated Systematic Scoping Review of the Literature. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2017;23(10):1607-13.

455. Delaney C, Heimfeld S, Brashem-Stein C, Voorhies H, Manger RL, Bernstein ID. Notch-mediated Expansion of Human Cord Blood Progenitor Cells Capable of Rapid Myeloid Reconstitution. *Nature medicine*. 2010;16(2):232.

456. Lam AC, Li K, Zhang XB, Li CK, Fok TF, Chang AM, et al. Preclinical ex vivo expansion of cord blood hematopoietic stem and progenitor cells: duration of culture; the media, serum supplements, and growth factors used; and engraftment in NOD/SCID mice. *Transfusion*. 2001;41(12):1567-76.

457. Fei XM, Wu YJ, Chang Z, Miao KR, Tang YH, Zhou XY, et al. Co-culture of cord blood CD34(+) cells with human BM mesenchymal stromal cells enhances short-term engraftment of cord blood cells in NOD/SCID mice. *Cytotherapy*. 2007;9(4):338-47.

458. Tetta C, Ghigo E, Silengo L, Deregibus MC, Camussi G. Extracellular vesicles as an emerging mechanism of cell-to-cell communication. *Endocrine*. 2013;44(1):11-9.

459. Wang L, Gu Z, Zhao X, Yang N, Wang F, Deng A, et al. Extracellular Vesicles Released from Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells Prevent Life-Threatening Acute Graft-Versus-Host Disease in a Mouse Model of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Stem Cells Dev*. 2016;25(24):1874-83.

460. De Luca L, Trino S, Laurenzana I, Lamorte D, Caivano A, Del Vecchio L, et al. Mesenchymal Stem Cell Derived Extracellular Vesicles: A Role in Hematopoietic Transplantation? *Int J Mol Sci*. 2017;18(5).

461. Xie H, Sun L, Zhang L, Liu T, Chen L, Zhao A, et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Microvesicles Support Ex Vivo Expansion of Cord Blood-Derived CD34(+) Cells. *Stem Cells Int*. 2016;2016:6493241.

462. Morhayim J, van de Peppel J, Braakman E, Rombouts EW, Ter Borg MN, Dudakovic A, et al. Osteoblasts secrete miRNA-containing extracellular vesicles that enhance expansion of human umbilical cord blood cells. *Sci Rep*. 2016;6:32034.

463. Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol*. 2006;Chapter 3:Unit 3.22.

464. Yu G, Kamano Y, Wang F, Okawa H, Yatani H, Egusa H, editors. Feeder Cell Sources and Feeder-Free Methods for Human iPS Cell Culture. Interface Oral Health Science 2014; 2015 2015//; Tokyo: Springer Japan.

465. Mannello F, Tonti GA. Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem Cells*. 2007;25(7):1603-9.

466. Eaton P, Quaresma P, Soares C, Neves C, de Almeida MP, Pereira E, et al. A direct comparison of experimental methods to measure dimensions of synthetic nanoparticles. *Ultramicroscopy*. 2017;182:179-90.

467. Gomes J, Lucien F, Cooper TT, Kim Y, Williams KC, Liao X, et al. Analytical Considerations in Nanoscale Flow Cytometry of Extracellular Vesicles to Achieve Data Linearity. *Thromb Haemost*. 2018.

468. Li CC, Eaton SA, Young PE, Lee M, Shuttleworth R, Humphreys DT, et al. Glioma microvesicles carry selectively packaged coding and non-coding RNAs which alter gene expression in recipient cells. *RNA Biol*. 2013;10(8):1333-44.

469. Schorey JS, Cheng Y, Singh PP, Smith VL. Exosomes and other extracellular vesicles in host–pathogen interactions. *EMBO Reports*. 2015;16(1):24-43.

470. Zuba-Surma EK, Kucia M, Abdel-Latif A, Lillard JW, Jr., Ratajczak MZ. The ImageStream System: a key step to a new era in imaging. *Folia Histochem Cytobiol*. 2007;45(4):279-90.

471. Yuana Y, Jiang L, Lammertink BHA, Vader P, Deckers R, Bos C, et al. Microbubbles-Assisted Ultrasound Triggers the Release of Extracellular Vesicles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(8):1610.

472. Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, Antoniou A, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines AU - Théry, Clotilde. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2018;7(1):1535750.

473. Yoshioka Y, Konishi Y, Kosaka N, Katsuda T, Kato T, Ochiya T. Comparative marker analysis of extracellular vesicles in different human cancer types. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2013;2:10.3402/jev.v2i0.20424.

474. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2016;113(8):E968-E77.

475. Ramirez M, Galli Amorim M, Gadelha C, Milic I, Welsh J, M Freitas V, et al. Technical Challenges of Working with Extracellular Vesicles2018. 881-906 p.

476. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A. Concise Review: Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*. 2014;32(6):1380-9.

477. Merchant S, Plo-Azevedo I. Isolation of Human Blood Progenitor and Stem Cells from Peripheral Blood by Magnetic Bead. *Bio-protocol*. 2012;2(21):e281.

478. Prince HM, Wall D, Rischin D, Toner GC, Seymour JF, Blakey D, et al. CliniMACS CD34-selected cells to support multiple cycles of high-dose therapy. *Cytotherapy*. 2002;4(2):147-55.

479. Mantha S, Savage DG, Nichols GL, Skerrett D, Hesdorffer CS. CD34⁺ Selection before Autologous Peripheral Blood Stem Cell Transplantation: Comparison of the Nexell Isolex and Miltenyi Biotec CliniMACS Systems. *Blood*. 2005;106(11):1070.

480. McNiece IK, Stoney GB, Kern BP, Briddell RA. CD34+ cell selection from frozen cord blood products using the Isolex 300i and CliniMACS CD34 selection devices. *J Hematother*. 1998;7(5):457-61.

481. Stainer CJ, Miflin G, Anderson S, Davy B, McQuaker IG, Russell NH. A comparison of two different systems for CD34+ selection of autologous or allogeneic PBSC collections. *J Hematother*. 1998;7(4):375-83.

482. de Wynter EA, Coutinho LH, Pei X, Marsh JC, Hows J, Luft T, et al. Comparison of purity and enrichment of CD34+ cells from bone marrow, umbilical cord and peripheral blood (primed for apheresis) using five separation systems. *Stem Cells*. 1995;13(5):524-32.

483. Bain B, Pshyk K. Enhanced reactivity in mixed leukocyte cultures after separation of mononuclear cells on Ficoll-Hypaque. *Transplant Proc*. 1972;4(2):163-4.

484. Romeu MA, Mestre M, Gonzalez L, Valls A, Verdaguer J, Corominas M, et al. Lymphocyte immunophenotyping by flow cytometry in normal adults. Comparison of fresh whole blood lysis technique, Ficoll-Paque separation and cryopreservation. *J Immunol Methods*. 1992;154(1):7-10.

485. Jahr H, Hering B, Federlin K, Bretzel RG. Activation of human complement by collagenase and ficoll. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1995;103 Suppl 2:27-9.

486. Detela G, Bain OW, Kim H-W, Williams DJ, Mason C, Mathur A, et al. Donor Variability in Growth Kinetics of Healthy hMSCs Using Manual Processing: Considerations for Manufacture of Cell Therapies. *Biotechnology Journal*. 2018;13(2):1700085.

487. Ferreira AdF, Cunha PdS, Carregal V, da Silva PC, Mendes n, Silva PdC, et al. Extracellular Vesicles from Adipose-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells Accelerate Migration and Activate AKT Pathway in Human Keratinocytes and Fibroblasts Independently of miR-205 Activity. *Stem Cells International*. 2017;2017:14.

488. Kim YJ, Yoo SM, Park HH, Lim HJ, Kim YL, Lee S, et al. Exosomes derived from human umbilical cord blood mesenchymal stem cells stimulates rejuvenation of human skin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;493(2):1102-8.

489. Webber J, Clayton A. How pure are your vesicles? *Journal of Extracellular Vesicles*. 2013;2:10.3402/jev.v2i0.19861.

490. Escrevente C, Keller S, Altevogt P, Costa J. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer*. 2011;11:108.

491. Feng D, Zhao WL, Ye YY, Bai XC, Liu RQ, Chang LF, et al. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic*. 2010;11(5):675-87.

492. Tian T, Zhu YL, Zhou YY, Liang GF, Wang YY, Hu FH, et al. Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery. *J Biol Chem*. 2014;289(32):22258-67.

493. Turturici G, Tinnirello R, Sconzo G, Geraci F. Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014;306(7):C621-33.

494. Dumont N, Boyer L, Emond H, Celebi-Saltik B, Pasha R, Bazin R, et al. Medium conditioned with mesenchymal stromal cell-derived osteoblasts improves the expansion and engraftment properties of cord blood progenitors. *Exp Hematol*. 2014;42(9):741-52.e1.

495. Wen S, Dooner M, Cheng Y, Papa E, Del Tatto M, Pereira M, et al. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles rescue radiation damage to murine marrow hematopoietic cells. *Leukemia*. 2016;30(11):2221-31.

496. Voermans C, Kooi ML, Rodenhuis S, van der Lelie H, van der Schoot CE, Gerritsen WR. In vitro migratory capacity of CD34+ cells is related to hematopoietic recovery after autologous stem cell transplantation. *Blood*. 2001;97(3):799-804.

497. Welf ES, Haugh JM. Signaling pathways that control cell migration: models and analysis. *Wiley interdisciplinary reviews Systems biology and medicine*. 2011;3(2):231-40.

498. Izumi Y, Kasamo K, Hiraoka T, Taniguchi T, Hamada Y, Sueda T. The Effect of Porphyromonas gingivalis Extracellular Vesicles on Neutrophil Membrane Fluidity. *Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (Journal of the Japanese Society of Periodontology)*. 1995;37(4):658-66.

499. Lasserre R, Guo XJ, Conchonaud F, Hamon Y, Hawchar O, Bernard AM, et al. Raft nanodomains contribute to Akt/PKB plasma membrane recruitment and activation. *Nat Chem Biol*. 2008;4(9):538-47.

500. Krauss K, Altevogt P. Integrin leukocyte function-associated antigen-1-mediated cell binding can be activated by clustering of membrane rafts. *J Biol Chem*. 1999;274(52):36921-7.

501. Wysoczynski M, Reca R, Ratajczak J, Kucia M, Shirvaikar N, Honczarenko M, et al. Incorporation of CXCR4 into membrane lipid rafts primes homing-related responses of hematopoietic stem/progenitor cells to an SDF-1 gradient. *Blood*. 2005;105(1):40-8.

502. Sahin AO, Buitenhuis M. Molecular mechanisms underlying adhesion and migration of hematopoietic stem cells. *Cell Adhesion & Migration*. 2012;6(1):39-48.

503. Walling BL, Kim M. LFA-1 in T Cell Migration and Differentiation. *Frontiers in Immunology*. 2018;9:952.

504. Nishikimi A, Ishihara S, Ozawa M, Etoh K, Fukuda M, Kinashi T, et al. Rab13 acts downstream of the kinase Mst1 to deliver the integrin LFA-1 to the cell surface for lymphocyte trafficking. *Sci Signal*. 2014;7(336):ra72.

505. Capece T, Walling BL, Lim K, Kim K-D, Bae S, Chung H-L, et al. A novel intracellular pool of LFA-1 is critical for asymmetric CD8⁺ T cell activation and differentiation. *The Journal of Cell Biology*. 2017.

506. Guo S, Lu J, Schlanger R, Zhang H, Wang JY, Fox MC, et al. MicroRNA miR-125a controls hematopoietic stem cell number. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(32):14229-34.

507. O'Connell RM, Chaudhuri AA, Rao DS, Gibson WS, Balazs AB, Baltimore D. MicroRNAs enriched in hematopoietic stem cells differentially regulate long-term hematopoietic output. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(32):14235-40.

508. Undi RB, Kandi R, Gutti RK. MicroRNAs as Haematopoiesis Regulators. *Adv Hematol*. 2013;2013:695754.

509. Montagner S, Deho L, Monticelli S. MicroRNAs in hematopoietic development. *BMC Immunol*. 2014;15:14.

510. Angulski AB, Capriglione LG, Batista M, Marcon BH, Senegaglia AC, Stimamiglio MA, et al. The Protein Content of Extracellular Vesicles Derived from Expanded Human Umbilical Cord Blood-Derived CD133+ and Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Partially Explains Why both Sources are Advantageous for Regenerative Medicine. *Stem Cell Rev*. 2017;13(2):244-57.

511. Aliotta JM, Pereira M, Johnson KW, de Paz N, Dooner MS, Puente N, et al. Microvesicle entry into marrow cells mediates tissue-specific changes in mRNA by direct delivery of mRNA and induction of transcription. *Exp Hematol*. 2010;38(3):233-45.

512. Forsberg EC, Passegue E, Prohaska SS, Wagers AJ, Koeva M, Stuart JM, et al. Molecular signatures of quiescent, mobilized and leukemia-initiating hematopoietic stem cells. *PLoS One*. 2010;5(1):e8785.

513. Kim A, Shim S, Kim MJ, Myung JK, Park S. Mesenchymal stem cell-mediated Notch2 activation overcomes radiation-induced injury of the hematopoietic system. *Sci Rep*. 2018;8(1):9277.

514. Ichikawa M, Goyama S, Asai T, Kawazu M, Nakagawa M, Takeshita M, et al. AML1/Runx1 negatively regulates quiescent hematopoietic stem cells in adult hematopoiesis. *J Immunol*. 2008;180(7):4402-8.

515. Tipping AJ, Pina C, Castor A, Hong D, Rodrigues NP, Lazzari L, et al. High GATA-2 expression inhibits human hematopoietic stem and progenitor cell function by effects on cell cycle. *Blood*. 2009;113(12):2661-72.

516. Mahmud N, Petro B, Baluchamy S, Li X, Taioli S, Lavelle D, et al. Differential effects of epigenetic modifiers on the expansion and maintenance of human cord blood stem/progenitor cells. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2014;20(4):480-9.

517. Wada T, Kikuchi J, Nishimura N, Shimizu R, Kitamura T, Furukawa Y. Expression levels of histone deacetylases determine the cell fate of hematopoietic progenitors. *J Biol Chem*. 2009;284(44):30673-83.

518. Hidalgo A, Frenette PS. Enforced fucosylation of neonatal CD34+ cells generates selectin ligands that enhance the initial interactions with microvessels but not homing to bone marrow. *Blood*. 2005;105(2):567-75.

519. Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA. Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood*. 2000;96(6):2022-36.

520. Su RJ, Li K, Yang M, Zhang XB, Tsang KS, Fok TF, et al. Platelet-derived growth factor enhances ex vivo expansion of megakaryocytic progenitors from human cord blood. *Bone Marrow Transplant*. 2001;27(10):1075-80.

521. Su RJ, Zhang XB, Li K, Yang M, Li CK, Fok TF, et al. Platelet-derived growth factor promotes ex vivo expansion of CD34+ cells from human cord blood and enhances long-term culture-initiating cells, non-obese diabetic/severe combined immunodeficient repopulating cells and formation of adherent cells. *Br J Haematol*. 2002;117(3):735-46.

522. De Angeli S, Del Pup L, Febas E, Conconi MT, Tommasini M, Di Liddo R, et al. Adrenomedullin and endothelin-1 stimulate in vitro expansion of cord blood hematopoietic stem cells. *Int J Mol Med*. 2004;14(6):1083-6.

523. Doan PL, Himburg HA, Helms K, Russell JL, Fixsen E, Quarmyne M, et al. Epidermal Growth Factor Regulates Hematopoietic Regeneration Following Radiation Injury. *Nature medicine*. 2013;19(3):295-304.

524. Piryani SO, Kam AYF, Kliassov EG, Chen BJ, Spector NL, Chute JP, et al. Epidermal Growth Factor and Granulocyte Colony Stimulating Factor Signaling Are Synergistic for Hematopoietic Regeneration. 2018;36(2):252-64.

525. Zhao M, Ross JT, Itkin T, Perry JM, Venkatraman A, Haug JS, et al. FGF signaling facilitates postinjury recovery of mouse hematopoietic system. *Blood*. 2012;120(9):1831-42.

526. Zumkeller W. The insulin-like growth factor system in hematopoietic cells. *Leuk Lymphoma*. 2002;43(3):487-91.

527. McMillen MA, Ferrara A, Schaefer HC, Goldenring JR, Zucker KA, Modlin IM. Cholecystokinin Mediates a Calcium Signal in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Is a Co-mitogen. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1990;594(1):399-402.

528. Gan B, Hu J, Jiang S, Liu Y, Sahin E, Zhuang L, et al. Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2010;468(7324):701-4.

529. Tatekawa T, Ogawa H, Kawakami M, Oka Y, Yasukawa K, Sugiyama H, et al. A novel direct competitive repopulation assay for human hematopoietic stem cells using NOD/SCID mice. *Cytotherapy*. 2006;8(4):390-8.