15 -10- 2018

Streszczenie pracy doktorskiej mgr Marty Adamiak

pt.: **„Charakterystyka właściwości biologicznych oraz potencjału regeneracyjnego pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z mysich indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych w modelu uszkodzenia mięśnia sercowego"**

Choroby sercowo-naczyniowe (ang. cardiovascular diseases, CVDs) należą do głównych schorzeń cywilizacyjnych XXI wieku i według Światowej Organizacji Zdrowia są powodem zgonu kilkunastu milionów osób rocznie. Obok standardowych metod leczenia farmakologicznego, wśród obiecujących podejść optymalizowanych w ciągu ostatnich kilkunastu lat wymienia się terapię regeneracyjną uszkodzonego mięśnia sercowego z użyciem komórek macierzystych (KM), w tym również indukowanych pluripotencjalnych KM (komórek iPS; z ang. induced pluripotent stem). Komórki iPS są zdolne do wielokierunkowego różnicowania i wielokrotnych podziałów, a ich dodatkową zaletą jest możliwość ich uzyskania z komórek somatycznych konkretnego dawcy, co czyni je potencjalnym źródłem dla przeszczepów autologicznych. Pluripotencja komórek iPS niesie jednak ze sobą ryzyko rozwoju pierwotnych guzów zbudowanych z komórek pochodzących z trzech listów zarodkowych, czyli potworniaków, co może stanowić potencjalny skutek uboczny zastosowania tych komórek u pacjentów. Aby przybliżyć perspektywę terapeutycznego wykorzystania komórek iPS potrzebne jest zatem opracowanie metod bezpiecznego wykorzystania ich potencjału biologicznego w regeneracji tkanek.

Rosnąca liczba doniesień z badań światowych, jak również badania naszego laboratorium, wskazują na możliwość wykorzystania w regeneracji uszkodzonych tkanek aktywności parakrynnej KM, której elementem jest uwalnianie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (ang. extracellular vesicles, EVs), stanowiących obłonione struktury zawierające fragment cytoplazmy i niosące bioaktywną zawartość komórki. Skład molekularny EVs (m.in. białka, mRNA i miRNA) jest ściśle zależny od rodzaju komórek, z których są one uwalniane, jak również determinuje efekt wywoływany przez EVs w komórkach docelowych. Biorąc pod uwagę powyższe, EVs z komórek iPS (iPS-EVs) mogą stanowić szczególnie atrakcyjny przedmiot badań z punktu widzenia regeneracji tkanek i innych potencjalnych zastosowań praktycznych.

Głównym celem badań realizowanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej było i) zbadanie potencjału biologicznego iPS-EVs, w tym ich składu molekularnego oraz ii) ich wpływu na funkcje komórek docelowych, w tym komórek śródbłonka mięśnia sercowego in vitro, a także iii) ocena możliwości potencjalnego zastosowania iPS-EVs w regeneracji uszkodzonego mięśnia sercowego in vivo.

W pierwszej części rozprawy potwierdzono pluripotencjalny charakter mysich komórek iPS uzyskanych w naszym laboratorium i namnażanych w warunkach bezsurowiczych oraz bez obecności komórek warstwy odżywczej, czyli w sposób umożliwiający uzyskanie iPS-EVs bez zanieczyszczenia pęcherzykami pochodzącymi z innego źródła. Następnie opracowano metodę izolacji iPS-EVs w oparciu o wirowanie różnicowe nadsączy hodowlanych i scharakteryzowano wielkość, morfologię oraz fenotyp uzyskanych iPS-EVs, zgodnie z kryteriami rekomendowanymi przez światowe towarzystwo skupiające badaczy EVs z całego świata (ISEV). Stosując mikroskopię sił atomowych i analizę śledzenia ruchu nanocząstek (ang. nanoparticle tracking analysis, NTA) wykazano, że iPS-EVs stanowią heterogenną pod

względem wielkości populację sferycznych pęcherzyków, z przeważającą komponentą obiektów o rozmiarze około 125 nm. W badanych preparatach potwierdzono obecność białek markerowych EVs (tetraspanin CD9 i CD81) i niezróżnicowanych KM (antygen powierzchniowy Ssea1) oraz mRNA markerów pluripotencji (Oct3/4A, Nanog i Rex1), co potwierdza ich wzbogacenie w iPS-EVs. Następnie zbadano profil ekspresji miRNA w iPS-EVs oraz komórkach rodzicielskich i wykazano, że wśród 282 miRNA wykrytych w komórkach iPS, 199 cząsteczek było również obecnych w iPS-EVs, w tym cząsteczki z rodziny miR-290-295 charakterystyczne dla komórek zarodkowych oraz miRNA pełniące kluczową rolę w regulacji procesu angiogenezy oraz kardioprotekcji. Globalna analiza proteomiczna, przeprowadzona z wykorzystaniem spektrometrii masowej, wykazała obecność 1965 białek w iPS-EVs, m.in. grupę białek zaangażowanych w regulację procesów rozwojowych oraz w komunikację międzykomórkową. Warto zaznaczyć, że na podstawie zastosowanych metod zidentyfikowano również grupy miRNA i białek, których obecność nie została potwierdzona w komórkach rodzicielskich, co świadczy o znacznym wzbogaceniu pęcherzyków w wybrane bioaktywne cząsteczki.

W kolejnej części rozprawy stosując mikroskopię fluorescencyjną potwierdzono, że iPS-EVs wiążą się do błony komórkowej i są internalizowane przez komórki docelowe - mysie komórki śródbłonka mięśnia sercowego (ang. mouse cardiac endothelial cells, MCEC) in vitro. Następnie, zbadano wpływ iPS-EVs na wybrane, istotne z punktu widzenia procesów regeneracji uszkodzonego mięśnia sercowego, funkcje MCEC in vitro, w tym na ich proliferację, przeżywalność w warunkach cytotoksycznych, aktywność migracyjną oraz potencjał angiogenny. Wykazano, że MCEC po stymulacji bioaktywnymi czynnikami przenoszonymi przez iPS-EVs i) wykazują zwiększony potencjał angiogenny, co wykazano w teście tworzenia kapilar na matriżelu oraz ii) zwiększoną przeżywalność w warunkach cytotoksycznych, co świadczy o cytoprotekcyjnym działaniu iPS-EVs. Nie stwierdzono natomiast znaczącego wpływu iPS-EVs na potencjał proliferacyjny oraz migracyjny badanych komórek.

W ostatnim etapie zbadano potencjał regeneracyjny iPS-EVs wykorzystując model ostrego niedokrwienia mięśnia sercowego u myszy in vivo, będący modelem uszkodzenia tkankowego towarzyszącego zawałowi mięśnia sercowego u ludzi. Na podstawie oceny echokardiograficznej zaobserwowano istotną statystycznie poprawę parametrów opisujących czynność skurczową lewej komory serca u myszy, którym bezpośrednio do uszkodzonej tkanki podano iPS-EVs, w porównaniu z grupą kontrolną zwierząt oraz grupą, której podano komórki iPS. Zaobserwowano także poprawę struktury histologicznej i anatomicznej mięśnia sercowego, jak również zwiększoną liczbę nowych naczyń krwionośnych po podaniu iPS-EVs, w tym w najbardziej uszkodzonej okolicy zawałowej. Co istotne, nie zaobserwowano niepożądanych skutków ubocznych takiej terapii, w tym rozwoju potworniaków w miejscu przeszczepienia pęcherzyków, co miało miejsce w przypadku podawania komórek iPS.

Podsumowując, w niniejszej pracy doktorskiej zbadano wielkość, morfologię i skład molekularny iPS-EVs, jak również potwierdzono ich istotny wpływ na wybrane funkcje biologiczne komórek serca in vitro oraz wykazano, że wykorzystanie iPS-EVs w regeneracji uszkodzonego mięśnia sercowego jest obiecującą strategią i w przyszłości może stanowić bezpieczną alternatywę dla obecnych metod terapii chorób sercowo-naczyniowych opartych na KM. Uzyskane wyniki otwierają także nowe możliwości dla przyszłych zastosowań komórek iPS w regeneracji tkanek, w oparciu o ich właściwości parakrynne.