03 -04- 2019

Mgr Elżbieta Karnas

Streszczenie pracy doktorskiej pt. „**Wpływ pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych na potencjał hematopoetyczny krwiotwórczych komórek macierzystych krwi pępowinowej**"

Zakład Biologii Komórki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ
Promotor: Dr hab. Ewa Zuba-Surma, Prof. UJ

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.