09 -01- 2019

Mgr Anna Łabędź-Masłowska

Zakład Biologii Komórki, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

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

Tytuł pracy doktorskiej: **„Ocena potencjału biologicznego mikropęcherzyków z hodowli antygenowo zdefiniowanych komórek macierzystych szpiku kostnego dla celów regeneracji tkanek".**

STRESZCZENIE

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

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

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

W pierwszym etapie wyizolowano oraz oceniono profil wieloantygenowy mysich szpikowych komórek MSCs, jako komórek rodzicielskich dla badanych EVs. Następnie z pożywek kondycjonowanych z hodowli komórek MSCs izolowano MSC-EVs - z zastosowaniem metody sekwencyjnego wirowania obejmującego ultrawirowanie. Wykazano, że MSC-EVs stanowią heterogenną populację pęcherzyków z przeważającą

komponentą mikrofragmentów błonowych (ektosomów) o wielkości około 170 nm. Dalsze badania izolatów MSC-EVs wykazały m.in. obecność frakcji wykazujących ekspresję tetraspanin (CD9, CD63, CD81), co świadczy o zawartości frakcji egzosomalnej, a także potwierdziły wzbogacenie badanych EVs we frakcję ektosomów przenoszących na swojej powierzchni antygeny błonowe typowe dla komórek rodzicielskich, w tym antygenów CD29, CD44, CD90, Sca-1 oraz receptora dla VEGF. W kolejnych etapach obejmujących m.in. poszerzoną analizę proteomiczną oraz transkryptomiczną, wykazano, że MSC-EVs przenoszą szereg białek regulujących m.in. morfogenezę tkanek i struktur anatomicznych, odpowiedź na uszkodzenie, gojenie się uszkodzeń oraz odpowiedzialnych za komunikację i adhezję międzykomórkową, jak również transkrypty mRNA dla genów o działaniu proangiogennym oraz prokardiomiogennym, a także cząsteczki mikroRNA zaangażowane m.in. w regulację procesów regeneracji tkanek. W dalszych badaniach *in vitro* wykazano także wpływ MSC-EVs na wybrane funkcje dojrzałych komórek śródbłonka naczyń serca, w tym na ich potencjał angiogenny. Wykazano także efekt cytoprotekcyjny MSC-EVs względem tych komórek, w warunkach imitujących mikrośrodowisko stanu zapalnego *in vitro*.

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

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

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

Anna Łabędź-Masłowska