

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej

Uniwersytetu Jagiellońskiego



PRACA DOKTORSKA

Izolacja subpopulacji mikropęcherzyków o różnych właściwościach biologicznych

z hodowli komórek śródbłonna

mgr Martyna Durak-Kozica

Promotor: dr hab. Ewa Stępień, prof. UJ

Zakład Fizyki Medycznej

Instytut Fizyki UJ

Kraków, 2020

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej

Uniwersytet Jagielloński

Oświadczenie

Ja niżej podpisana *Martyna Durak-Kozica* (nr indeksu:1027449) doktorantka Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego oświadczam, że przedłożona przeze mnie rozprawa doktorska pt. „Izolacja subpopulacji mikropęcherzyków o różnych właściwościach biologicznych z hodowli komórek śródbłónka.” jest oryginalna i przedstawia wyniki badań wykonanych przeze mnie osobiście, pod kierunkiem dr hab. prof. UJ *Ewy Stępień*. Pracę napisałam samodzielnie.

Oświadczam, że moja rozprawa doktorska została opracowana zgodnie z Ustawą o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dnia 4 lutego 1994 r. (Dziennik Ustaw 1994 nr 24 poz. 83 wraz z późniejszymi zmianami).

Jestem świadoma, że niezgodność niniejszego oświadczenia z prawdą ujawniona w dowolnym czasie, niezależnie od skutków prawnych wynikających z ww. ustawy, może spowodować unieważnienie stopnia nabytego na podstawie tej rozprawy.

.....

Kraków, dnia

.....

podpis doktorantki

PODZIĘKOWANIA

Pragnę serdecznie podziękować Pani Promotor, Pani prof. dr hab. Ewie Stępień za nieocenioną pomoc, wsparcie oraz wszystkie cenne wskazówki przekazane podczas realizacji badań oraz przygotowywania niniejszej pracy.

Szczególne podziękowania ślę w stronę dr Andrzeja Wróbla za nieocenioną pomoc w analizie wyników oraz okazaną życzliwość.

Chciałabym podziękować wszystkim koleżankom i kolegom z Zakładu Fizyki Medycznej UJ za liczne burzliwe dyskusje, miłą atmosferę pracy i okazaną życzliwość.

Chciałabym serdecznie podziękować wszystkim osobom, bez których współpracy niemożliwe byłoby przygotowanie niniejszej pracy doktorskiej: prof. Zenon Rajfur, mgr inż. Zbigniew Baster, dr hab. Małgorzata Przybyło, mgr Magdalena Surman, dr Mark Platt oraz dr Olga Woźnicka.

Rodzicom, rodzeństwu, teściom, cioci Eli za wsparcie, życzliwość i pomoc, abym mogła zrealizować wyznaczony cel.

Największe słowa uznania kieruje w stronę męża Szymona oraz dzieci Irenki i Zygmunika za wyrozumiałość, okazaną miłość i wsparcie, które umożliwiło mi uwierzyć, że nie ma rzeczy nieosiągalnych.

Śp. Dziadkom Irenie oraz Maksymilianowi dziękuję za wychowywanie mnie w przekonaniu, że świat nauki jest drogą, którą warto podążać w życiu.

Dziadku, to dla Ciebie.....

Lista publikacji:

1. Mardyla A, **Durak M**, Gregoraszcuk EŁ, Effects of resistin on porcine ovarian follicle steroidogenesis in prepubertal animals: an in vitro study, *Reprod Biol Endocrinol*. 2013;11:45 IF: 3,21 , PUNKTY MNiSW : 20
2. Stępień E, **Durak-Kozica M**, Kamińska A, Targosz-Korecka M, Libera M, Tylko G, Opalińska A, Kapusta M, Solnica B, Georgescu A, Costa MC, Czyżewska-Buczyńska A, Witkiewicz W, Małecki MT, Enguita FJ., Circulating ectosomes: Determination of angiogenic microRNAs in type 2 diabetes mellitus, *Theranostics* 2018; 8: 3874-90 IF 8.537, Punkty MNiSW 45
3. Majka M, **Durak-Kozica M**, Kamińska A, et al. The effects of subdiffusion on the NTA size measurements of extracellular vesicles in biological samples. *arXiv preprint arXiv:1701.09001* , brak IF i punktów MNiSW
4. **Durak-Kozica M**, Baster Z, Kubat K, Stępień E, 3D visualization of extracellular vesicle uptake by endothelial cells. *Cellular & Molecular Biology Letters* 2018; 23:57, IF 3.367, Punkty MNiSW 15
5. **Durak-Kozica M**, Paszek E, Stępień E. Role of the Wnt signalling pathway in the development of endothelial disorders in response to hyperglycaemia. *Expert Rev Mol Med* 2019;7:1–12. doi: 10.1017/erm.2019.8, IF 4.407 , Punkty MNiSW 100
6. **Durak-Kozica M**, Enguita FJ, Stępień E. Targeting uPAR in diabetic vascular pathologies. *Postępy Hig Med Dośw*, 2019; 73: 803–808, IF 1.106, Punkty MNiSW 40
7. Misztal K., Pocha A., **Durak-Kozica M**, Wątor M., Kubica-Misztal A., Hartel M. The importance of standardisation–COVID-19 CT&Radiograph Image Data Stock for deep learning purpose. *Comput Biol Med*. 2020; 104092, IF 3.343, Punkty MNiSW 100

Badania prezentowane w niniejszej pracy doktorskiej zostały zrealizowane w ramach finansowania przyznanego dla M. Durak-Kozicy z Narodowego Centrum Nauki, projekt Preludium 8 nr UMO-2014/15/N/NZ5/01606 pt. „Udział receptora dla urokinazowego aktywatora plazminogenu w procesie formowania i internalizacji mikrocząstek pochodzenia śródbłonkowego w warunkach hiperglikemii”.

Streszczenie

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EV) to heterogeniczne pęcherzyki błonowe o wielkości 30-5000 nm, które transportują białka, niekodujące RNA (miRNA), lipidy i metabolity. Główne populacje obejmują egzosomy, ektosomy i ciała apoptotyczne.

Moja rozprawa doktorska koncentruje się na aspektach teoretycznych oraz doświadczalnych charakterystyki właściwości fizycznych, molekularnych i biologicznych dwóch subpopulacji EV: egzosomów i ektosomów.

Celem pracy doktorskiej było porównanie rozkładu wielkości EV uzyskanych w różnych warunkach wirowania różnicowego, w tym ultrawirowania z wynikami opracowanymi na podstawie modelu teoretycznego. W oparciu o te wyniki wybrano najbardziej odpowiednie parametry do izolacji EV (dla ektosomów 18.000xg i 150.000xg dla egzosomów) i zbadano właściwości molekularne i biologiczne izolowanych EV. Badania biologiczne zostały przeprowadzone na dwóch unieśmiertnionych liniach komórek śródbłónka (TIME i HUVEC) w modelu cukrzycy *in vitro* (25mM D-glukozy) oraz w warunkach prawidłowych (5mM D-glukozy). Jako kontrolę osmomolarną zastosowano 5mM L-glukozę, której komórki nie metabolizują.

Do charakterystyki właściwości fizycznych posłużono się metodami fizycznymi: transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM), dostrajana konduktometria pulsowa (TRPS) oraz mikroskopia konfokalna i fluorescencyjna. Metodami molekularnymi były ilościowa reakcja łańcuchowej polimerazy (qPCR) i metoda Western blot, do metod biologicznych zaliczały się test krzepnięcia i cytometria przepływowa.

Uzyskane wyniki wskazują na to, że EV izolowane opracowaną w pracy doktorskiej metodą wirowania różnicowego z komórek śródbłónka wykazują różne właściwości biologiczne (fibrynolityczne), co sugeruje ich potencjalną rolę w powikłaniach cukrzycowych, tj. retinopatii. Właściwości te mają związek ze ścieżką sygnalizacyjną *Wnt* w komórkach, przez co udowodniłam że EV odgrywają ważną rolę w procesach komunikacji międzykomórkowej.

Słowa kluczowe: pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, wirowanie różnicowe, fibrynoliza

Abstract

Extracellular vesicles (EVs) are heterogeneous 30-5000 nm membrane vesicles that transport proteins, non-coding RNAs (miRNAs), lipids and metabolites. Major populations include exosomes, ectosomes and apoptotic bodies.

My doctoral dissertation focuses on theoretical and experimental aspects of the physical, molecular and biological characteristics of two EV subpopulations: exosomes and ectosomes.

The aim of my PhD dissertation was to compare the distribution of EVs obtained under different conditions of differential centrifugation, including ultracentrifugation, with the results developed on the basis of a theoretical model. Based on these results, the most appropriate parameters for EV isolation (for ectosomes 18.000xg and 150.000xg for exosomes) were selected and molecular and biological properties of isolated EVs were examined. Biological studies were performed on two immortalized endothelial cell lines (TIME and HUVEC) in a model of diabetes *in vitro* (25mM D-glucose) and normal conditions (5mM D-glucose). As osmolar control, not metabolized by cells L-glucose in concentration of 5mM was used.

The following physical methods were used to characterize the physical properties: Transmission Electron Microscopy (TEM), Tuneable Resistive Pulse Sensing (TRPS) as well as confocal and fluorescence microscopy. Molecular methods included quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and the western blot method, biological methods included coagulation test and flow cytometry.

The obtained results indicate that EVs isolated by differential centrifugation from endothelial cells exhibit varied biological (fibrinolytic) properties, suggesting their potential role in diabetic complications, i.e. retinopathies. It is likely that such properties are related with the *Wnt* signaling pathway and play an important role in biological processes and cell-to-cell communication.

Key words: Extracellular vesicles, differential centrifugation, fibrinolysis

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

Wykaz zastosowanych skrótów:

AcA (z łac. *acidum aminocaproicum*) – Kwas ε-aminokapronowy

AP2 (z ang. *adaptor protein 2*) – białko adaptorowe 2

APC (z ang. *Adenomatous polyposis coli*) – białko gruczolakowatego polipa okrężnicy

Apro (z ang. *Aprotinin*) – aprotynina

ARF6 (z ang. *ADP-ribosylation factor 6*) – czynnik 6 uczestniczący w ADP-rybozylacji białek

ARRDC1 (z ang. *Arrestin Domain-Containing protein 1*) – białko-1 zawierające domenę arestyny

bFGF (z ang. *basic Fibroblast Growth Factor*)- podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów

BMEC (z ang. *Brain Microvascular Endothelial Cells*) – komórki śródbłónka mikronaczyn mózgu

BSA (z ang. *Bovine serum albumin*) – surowicza albumina wołowa

Cdc42 (z ang. *Cell division control protein 42*) – białko 42 kontrolujące podziały komórkowe

cDNA (z ang. *complementary DNA*) – komplementarne DNA

CK1α (z ang. *Casein kinases 1α*) – kinaza kazeinowa 1α

cycD1 (z ang. *cyclin D1*) – cyklina D1

DLS (z ang. *Dynamic Light Scattering*) – Dynamiczne rozproszenie światła

DNA (z ang. *deoxyribonucleic acid*) – kwas deoksyrybonukleotydowy

DR (z ang. *Diabetic Rethinopathy*) – retinopatia cukrzycowa

Dvl (z ang. *Dishevelled*) - białko odpowiedzialne za wiązanie aksyny do kompleksu receptorowego Frizzled/LRP

ECM (z ang. *extracellular matrix*) – macierz zewnątrzkomórkowa

ERK (z ang. *Extracellular signal-Regulated Kinases*) – kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo

ESCRT (z ang. *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*) – endosomalny kompleks sortujący

EVs (z ang. *Extracellular Vesicles*) – pęcherzyki zewnątrzkomórkowe

Fz (z ang. *Frizzled*) – Frizzled receptor

GAPDH (z ang. *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) – Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego

GPI (z ang. *Glycosylphosphatidylinositol*) – Glikozylofosfatydyloinozytol

GSK3beta (z ang. *Glycogen synthase kinase 3β*) – Kinaza syntazy glikogenu 3 beta

HIF1 (z ang. *Hypoxia-Inducible Factor 1*) – Czynn timer indukowany hipoksją 1

HUVEC (z ang. *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) – Ludzkie komórki śródbłnka żyły pępowinowej

ICAM-1 (z ang. *Intercellular Adhesion Molecule-1*) – cząsteczka adhezji międzykomórkowej

ILVs (z ang. *Intraluminal Vesicles*) – pęcherzyki światła endosomu

LALS (z ang. *Large Angle Light Scatter*) – duży kąt rozproszenia światła

LDL-1 (z ang. *Low-Density Lipoprotein 1*) — lipoproteiny niskiej gęstości 1

LEF (z ang. *Lymphoid enhancer-binding factor 1*) - czynnik 1 wiążący wzmacniacz limfatyczny

LRP-1 (z ang. *LDL-receptor-related protein 1*) - białko związane z receptorem LDL 1

MALS (z ang. *Middle Angle Light Scatter*) - średni kąt rozproszenia światła

MC (z ang. *Monte Carlo*) - symulacje Monte Carlo

miRNA (z ang. *micro RNA*) - mikro RNA

MLC (z ang. *Myosin Light Chain*)- lekki łańcuch miozyny

MLCK (z ang. *Myosin Light Chain Kinase*)- kinaza lekkiego łańcucha miozyny

MMP (z ang. *Matrix Metalloproteinases*) - metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej

mRNA (z ang. *messenger RNA*) - informacyjne RNA

mtRNA (z ang. *mitochondrial RNA*) - mitochondrialne RNA

MVB (z ang. *Multivesicular Bodies*) - ciała wielopęcherzykowe

ncRNA (z ang. *non-coding RNA*) - nie kodujące RNA

NTA (z ang. *Nanoparticle Tracking Analysis*) - Analiza trajektorii nanocząstek

PAI-1 (z ang. *Plasminogen Activator Inhibitor 1*) - inhibitor aktywatora plasminogenu 1

PAI-2 (z ang. *Plasminogen Activator Inhibitor 2*) - inhibitor aktywatora plasminogenu 2

PBS (z ang. *Phosphate Buffered Saline*) - buforowana fosforanem sól fizjologiczna

PKC β (z ang. *Protein Kinase C β*) - kinaza białkowa C β

PLD (z ang. *Phospholipase D*) - fosfolipaza D

PP2A (z ang. *Protein phosphatase 2*) - Białka fosfatazy 2

PPP (z ang. *Platelet-Poor Plasma*)- osocze ubogopłytkowe

proMMP (z ang. *proenzyme Matrix Metalloproteinase-7*) - proenzym metaloproteinazy 7 macierzy pozakomórkowej

pro-uPA (z ang. *pro- Urokinase-type Plasminogen Activator*) - zymogen urokinazowego aktywatora plazminogenu

RNA (z ang. *Ribonucleic acid*) - kwas rybonukleinowy

ROR2 (z ang. *Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 2*) - Transbłonowy receptor kinazy tyrozynowej

Ryk (z ang. *Related to Receptor Tyrosine Kinase*) - zależna od receptora kinaza tyrozynowa

SALS (z ang. *Small Angle Light Scatter*) - mały kąt rozproszenia światła

sc-uPA (z ang. *single chain Urokinase Plasminogen Activator*) - jednołańcuchowy urokinazowy aktywator plazminogenu

Sp1 (z ang. *Specificity protein 1*) - białko specyficzności 1

TCF (z ang. *T-cell factor*) – czynnik transkrypcyjny komórek T

TEM (z ang. *Transmission Electron Microscopy*) – transmisyjny mikroskop elektronowy

TERT (z ang. *Telomerase Reverse Transcriptase*) - odwrotna transkryptaza telomerazy

TF (z ang. *Tissue Factor*) - czynnik tkankowy

TGF β (z ang. *Transforming Growth Factor β*) - transformujący czynnik wzrostu β

tPA (z ang. *tissue-type Plasminogen Activator*) - tkankowy aktywator plazminogenu

TRPS (z ang. *Tunable Resistive Pulse Sensing*) - Przechwytywanie rezystancyjne wykrywanie impulsu

TSG101 (z ang. *Tumor Susceptibility 101 Gene*) - gen podatności na nowotwory 101

uPA (z ang. *Urokinase-type Plasminogen Activator*) – urokinazowy aktywator plazminogenu

uPAR (z ang. *urokinase-type Plasminogen Activator Receptor*) - receptor dla urokinazowego aktywatora plazminogenu

VEGF (z ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*) - czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego

Wnt (z ang. z połączenia słów *Wingless* i *Int*) - szlak sygnalizacyjny Wnt, nazwa pochodzi z połączenia nazw dwóch genów muszki owocówki: *Wingless* i *Int*

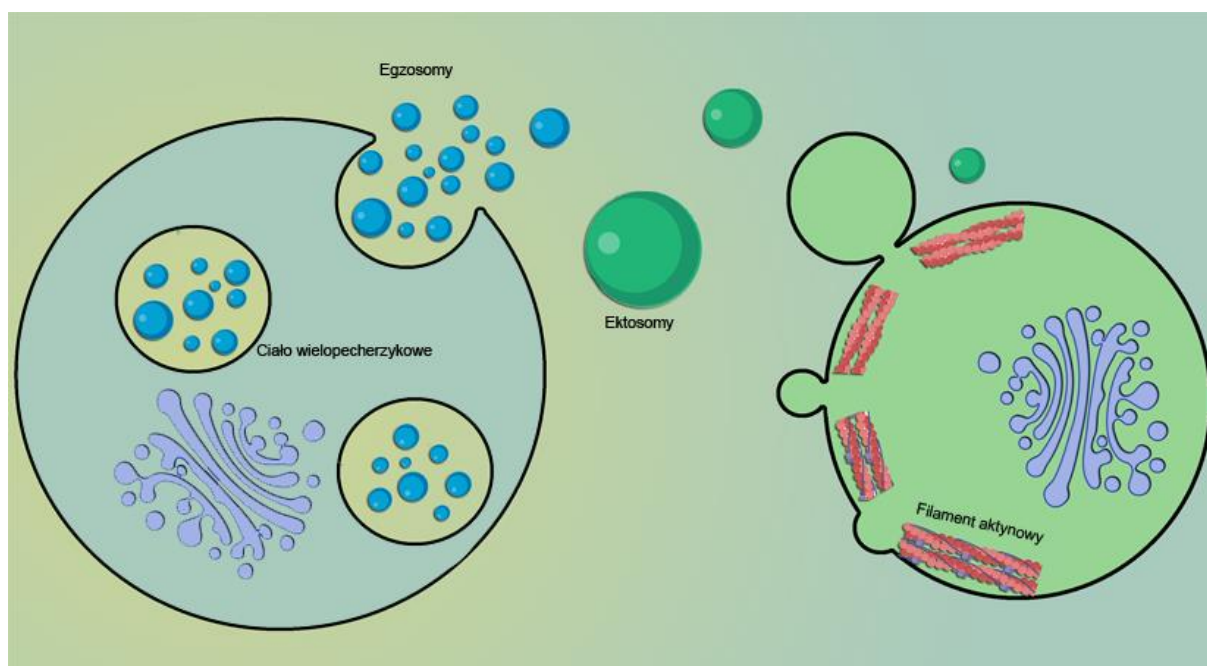
Spis treści

CZĘŚĆ TEORETYCZNA	7
1. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EV).....	14
2. Fibrylizacja	24
3. Szlak sygnalizacyjny Wnt	28
4. Teoretyczny model do analizy izolacji pęcherzyków zewnątrz-komórkowych (EVs) z wykorzystaniem technik wirowania różnicowego:	31
5. Metoda Monte Carlo	35
6. Technologia TRPS	36
7. Zeta potencjał	39
8. Cytometria przepływowa Apogee	41
9. Cel pracy doktorskiej	42
MATERIAŁY I METODY:	43
10. Materiały i metody:	44
10.1. Hodowla komórek TIME oraz HUVEC.	44
10.3. Izolacja EV.....	46
10.4. Pomiar wielkości oraz koncentracji EV przy użyciu metody qNano.	47
10.5. Pomiar Zeta-potencjału mikropęcherzyków przy użyciu metody qNano.....	47
10.6. Wizualizacja mikropęcherzyków przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM).	48
10.7. Analiza właściwości fibrynolitycznych wyizolowanych mikropęcherzyków.	48
10.8. Analiza aktywności urokinazy (uPA) w EV.	49
10.9. Analiza ekspresji uPAR oraz beta-keniny w lizatach komórkowych oraz EV zmierzona metodą western blot.	49
10.10. Analiza ekspresji markerów powierzchniowych EV przy użyciu cytometrii przepływowej.....	50
10.11. Wizualizacja internalizacji EV przy użyciu mikroskopii konfokalnej.	50
10.12. Wizualizacja uPAR i beta-keniny w komórkach przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej.....	51
10.13. Analiza ekspresji uPAR, beta-keniny, LEF1, RUNX w komórkach przy użyciu metody qPCR.....	51
10.14. Analiza statystyczna.....	52
WYNIKI.....	53
11. Porównanie wyników z doświadczeń z modelem teoretycznym	54

11.1.	Opracowanie modelu teoretycznego oraz weryfikacja modelu teoretycznego za pomocą eksperymentu zliczania wielkości mikropęcherzyków	54
11.2.	Pomiar Zeta-potencjału ektosomów oraz egzosomów wyizolowanych z komórek TIME. 57	
12.	Charakterystyka mikropęcherzyków	58
12.1.	Zobrazowanie mikropęcherzyków przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego.	58
13.	Ocena właściwości biologicznych mikropęcherzyków	61
13.1.	Pomiar wielkości mikropęcherzyków izolowanych z hodowli normo- i hiperglikemicznych w oparciu o metodę qNano.	61
13.2.	Pomiar właściwości fibrynolitycznych mikropęcherzyków.	62
13.3.	Aktywność urokinazy w mikropęcherzykach.	63
13.4.	Analiza markerów powierzchniowych przy użyciu cytometrii przepływowej Apogee 64	
14.	Ekspresja uPAR i beta-kateniny w komórkach oraz wyizolowanych mikropęcherzykach.....	67
15.	Wizualizacja internalizacji EV.	72
16.	Ocena kolokalizacji uPAR i beta-kateniny.....	73
17.	Analiza ekspresji genów związanych ze szlakiem sygnalizacyjnym Wnt	76
18.	DYSKUSJA.....	78
18.1.	Izolacja mikropęcherzyków.	78
18.2.	Charakterystyka mikropęcherzyków.	81
18.3.	Ocena właściwości fibrynolitycznych mikropęcherzyków.	82
18.4.	Internalizacja mikropęcherzyków.	83
18.5.	Wpływ hiperglikemicznej dawki D-glukozy na kolokalizację uPAR/ beta-katenina oraz ekspresję genów związanych z fibrynolizą oraz szlakiem sygnalizacyjnym Wnt.....	84
19.	WNIOSKI.....	85
20.	SUPLEMENTY	86
20.1.	Wydruk programu do modelu części teoretycznej.	86
20.2.	Wyniki wylosowanych wartości gęstości mikropęcherzyków oraz lepkości medium.	86
20.3.	Obliczenia wydajności sedymentacji albuminy i fibrynogenu.	88
21.	SPIS TABEL	91
22.	SPIS ILUSTRACJI:.....	92
23.	SPIS LITERATURY	95

1. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EV)

Komunikacja międzykomórkowa odgrywa istotną rolę w procesach zachodzących w organizmach wielokomórkowych. Można wyróżnić komunikację zachodzącą w sposób bezpośredni poprzez kontakt komórka-komórka, transport wydzielonych substancji (m.in. hormonów) oraz transport pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (z ang. *Extracellular Vesicles* – EVs) [1]. Są to heterogeniczne błonowe pęcherzyki wielkości 30-5000 nm, które transportują miRNA, niekodujące RNA, białka, lipidy oraz metabolity. W zależności od sposobu powstawania oraz ich wielkości wyróżniamy: ciała apoptotyczne, ektosomy oraz egzozomy (Ryc.1). Pęcherzyki te wytwarzane są w warunkach fizjologicznych przez komórki różnego pochodzenia oraz po aktywacji/stymulacji, a także w warunkach patologicznych [2,3]. Ich obecność dotychczas wykazano w płynach ustrojowych, tj. krew [4], płyn mózgowo-rdzeniowy [5], mocz [6,7], mleko [8,9], sperma [10,11], płyn otrzewnowy [12], ślina [13], płyn owodniowy [14] oraz żółć [15].



Rysunek 1 Schemat powstawania ektosomów oraz egzozomów. Przygotowano w oparciu o rysunek wykonany przez E. Stępień [16].

Tabela 1 Porównanie trzech populacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.

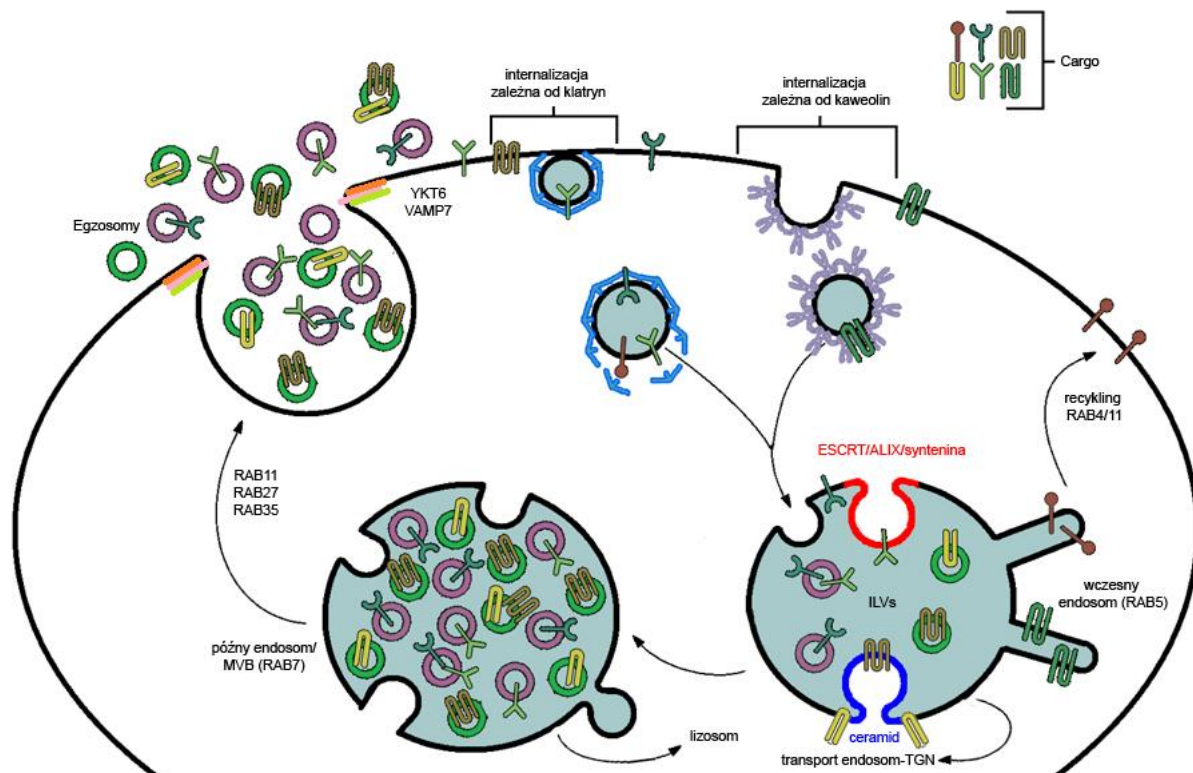
	Egzosomy	Ektosomy	Ciałka apoptotyczne
Wielkość [nm]	30-100 [17]	100-1000 [17]	>500 [17]
Morfologia	Jednorodny kształt dyskoidalny [17]	Niejednorodne, nieregularne [17]	Niejednorodne, nieregularne [17]
Pochodzenie	Szlak endolizosomalny, ciała wielopęcherzykowe [17]	Odpączkowanie błony komórkowej [17]	Uwypuklenie błony komórkowej [17]
Gęstość wypornościowa [g/mL]	1.13–1.19 [18]	1.25–1.30 [18]	1.16–1.28 [18]
Metody izolacji	Ultrawierowanie w gradiencie gęstości (100.000-200.000xg), Immunoprecypitacja (np. Exoquick zestaw z Invitrogenu) [17]	Ultrawierowanie (10.000-80.000xg) [19,20]	Brak standaryzowanych protokołów [21]
Molekularne „cargo”	mRNA, miRNA, ncRNA, mtDNA [22,23]	mRNA, miRNA, ncRNA, mtDNA [24, 25]	Fracje jądrowe, organelle komórkowe
Markery	Tetraspaniny (CD9, CD63, CD81, CD82), TSG101, Alix, flotylina, [17]	Integryny, selektyny, CD40, flotylina-2, aneksyna V [17]	Aneksyna V, fosfatydyloseryna, histony [26,27,28]
Lipidy	Ceramid, cholesterol, sfingomielina i kwas lizofosfatydowy [29,30,31]	Cholesterol [32,33]	Fosfatydyloseryna [17]
Biogeneza	Egzocytoza ciałek	Pączkowanie	Odpączkowanie

	wielopęcherzykowych za pośrednictwem kompleksu ESCRT lub sfingomielinazy oraz uwolnienie przez Rab-GTPase i białka SNARE [17,34]	i rozszczepienie błony plazmatycznej przez wapń wewnątrzkomórkowy [17,35]	z błony komórkowej [17]
--	---	---	----------------------------

1.1. Egzosomy

Egzosomy są uwalniane przez komórki na drodze egzocytozy z określonego typu późnego endosomu o nazwie ciało wielopęcherzykowe (MVB z ang. *MultiVesicular Bodies*). Ciała te zawierają uprzednio wytworzone egzosomy, zdefiniowane jako pęcherzyki światła endosomu (ILV z ang. *IntraLuminal Vesicles*) przed egzocytozą, które są generowane przez pączkowanie w świetle błony późnych endosomów [36]. Egzosomy są mniejsze od ektosomów (od 30 do 100 nm), a ze względu na ich endosomalne pochodzenie, zazwyczaj zawierają białka zaangażowane w transport błonowy i fuzję, składniki ESCRT (eskortyny) i tetraspaniny (CD63, CD9 i CD81) [37].

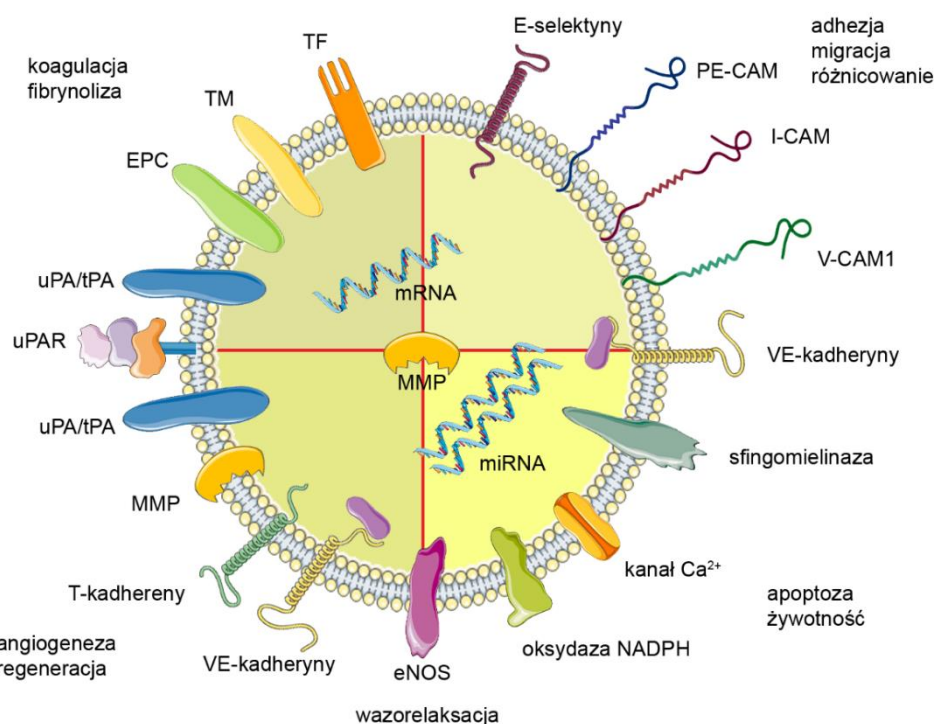
Tworzenie ILV podczas konwersji późnych endosomów do MVB wiąże się z akumulacją na poziomie tworzącego się pęcherzyka różnych lipidów, w tym ceramidu, cholesterolu oraz sfingomielin. Wiadomo, iż ceramidy odgrywają ważną rolę w pączkowaniu pęcherzyków [38,39]. Rosnący ILV jest załadowany białkami, lipidami i RNA. Inny proces, ubikwitynacja został zaproponowany jako kluczowy do upakowania specyficznych białek do ILV. Ubikwitynowane białka są dostarczane do pęcherzyka przez połączone działanie czterech kompleksów ESCRT i związanego z nimi kompleksu AAA ATPazy Vps4 [36, 40, 41]. Dodatkowo, w celu selekcji ładunku, kompleksy ESCRT regulują również przebudowę błony wymaganej do pączkowania ILV [36]. Aktywność ESCRT nie jest konieczna dla tworzenia pęcherzyków i podgrupy ILV mogą być generowane w niezależnym od ESCRT, stymulowany lipidami sposób [40,41,42]. Podczas egzocytozy, pęcherz ściskający w świetle MVB jest podtrzymywany przez polimeryzację cytoszkieletu aktynowego, która z kolei jest regulowana przez kilka małych GTPaz, w tym ARF6, Cdc42, i członków rodziny Rab. Ostatni etap biogenezy egzosomów, egzocytoza ILV, jest nadal słabo poznana, ale zidentyfikowano kilka molekularnych cząsteczek zaangażowanych w ten proces, w tym małe GTPazy z rodziny Rab (Rab11, Rab27 i Rab35) i kompleks SNARE [36].



Rysunek 2 Biogeneza egzosomów. Rysunek przygotowany w oparciu o rysunek wykonany przez I.J. McGough [⁴³]. Egzosomy powstają z endosomalnego kompartmentu komórki. Po internalizacji endosomy przemieszczają się do wnętrza komórki i łączą ze sobą tworząc RAB5-dodatnie wczesne endosomy. Wewnętrzne pączkowanie błony endosomalnej jest napędzane przez kompleks ESCRT lub domeny bogate w ceramid, co prowadzi do tworzenia pęcherzyków światła endosomów, które są nazywane późnymi endosomami lub ciałami wielopęcherzykowymi (MVB). Ładunek, inaczej nazywany cargo, może być następnie skierowany do lizosomu (gdzie ulega degradacji w kwaśnym lizosomalnym środowisku [⁴⁴]) lub MVB mogą być transportowane do błony plazmatycznej (poprzez aktywność RAB11, 27 lub 35), gdzie ulegają fuzji z błoną komórkową za pośrednictwem białek SNARE, takich jak YKT6 i VAMP7, co skutkuje uwolnieniem egzosomów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (egzocytoza).

1.2. Ektosomy

Ektosomy (inaczej nazwane onkosomami, mikropęcherzykami) są pęcherzykami wielkości 100 do 1000 nm, które powstają z komórek poprzez uwypuklenie błony komórkowej. Po raz pierwszy zostały opisane w 1967 roku przez Petera Wolfa, który opisał prokoagulacyjne pochodne płytek krwi, pierwotnie nazwane „pyłem płytkowym” (z ang. „*platelet dust*”), obecnie nazywane mikropęcherzykami pochodzącymi z płytek krwi (PMP z ang. *platelet-derived microvesicles*) [45].



Rysunek 3 Schemat budowy ektosomu. Opracowany w oparciu o rysunek wykonany przez E. Stępień [46].

Ektosomy są uwalniane przez pęczkowanie błony plazmatycznej w drodze mechanizmu opartego o przebudowę cytoszkieletu. Kilka cząsteczek tworzących cargo jest selektywnie wbudowywanych w błonę oraz upakowywanych do powstającego pęcherzyka, w tym lipidy (tj. cholesterol i ceramid), kwasy nukleinowe (tj. mRNA i miRNA), białka i inne cząsteczki bioaktywne. Dodatkowo pęcherzyki te charakteryzują się obecnością swoistych antygenów powierzchniowych błony komórkowej, które pozwalają dokładnie zidentyfikować ich pochodzenia komórkowego.

Biogeneza ektosomów wymaga skomplikowanych procesów wspomagających transport cargo, segregację lipidów i uwolnienie pęcherzyków. Zmiany lokalnego składu lipidów i rekrutacja translokazy fosfolipidowej przyczyniają się do powstania krzywizny błony plazmatycznej, ułatwiając tym samym wytwarzanie pęcherzyków [47]. Badania przeprowadzone w 2015 roku przez Coccuci i wsp. wykazały, że składnik endosomalnego kompleksu sortującego wymagany do transportu (ESCRT), który odgrywa główną rolę w transporcie endosomalnym oraz biogenezie egzosomów, również bierze udział w uwalnianiu ektosomów [48]. Gen podatności na nowotwory 101 (TSG101 z ang. *Tumor Susceptibility Gene 101*), składnik kompleksu ESCRT I, wspomaga pączkowanie pęcherzyków poprzez interakcję z białkiem-1 zawierającym domenę arestyny (ARRDC1 z ang. *Arrestin Domain-Containing protein 1*). Ponadto kompleks III ESCRT jest zaangażowany w późne fazy biogenezy ektosomów i pośredniczy w oderwaniu pęcherzyka od błony plazmatycznej [49].

Białka tworzące cargo są wybierane i sortowane na różne sposoby. Modyfikacje białek zakotwiczonych w błonie plazmatycznej, takie jak mirystoilacja i palmitylacja, przyczyniają się do kierowania wysoce oligomerycznego białka do domen pączkowania ektosomów. Ponadto różne białka, w tym czynnik difosforanu adenozyliny i rybozylacji 6 (ARF6 z ang. *ADP-Ribosylation Factor 6*), białko 22a związane z Ras, rozpuszczalny w pęcherzykach receptor białka przyłączeniowego NSF, białko błonowe 3 związane z pęcherzykiem, wewnętrzny antygen T-komórkowy 1 i Argonaute 2, mogą być zaangażowane w transport białek i kwasów nukleinowych do ektosomów, w zależności od funkcji komórki oraz bodźca powodującego powstanie pęcherzyków [50].

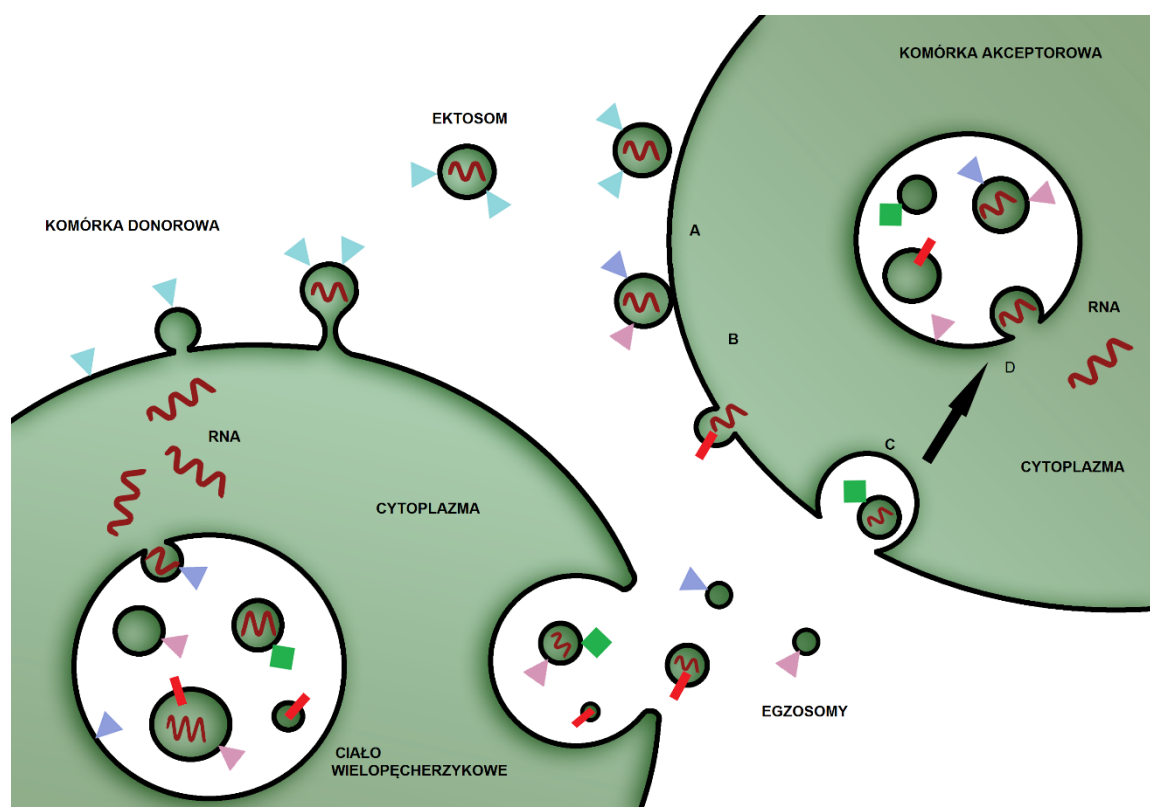
Uwolnienie ektosomów z błony plazmatycznej jest wspomagane przez zależny od ATP skurcz struktur cytoszkieletu aktyny/miozyny, który jest podtrzymywany przez wzrost stężenia Ca^{2+} w cytozolu [36,50]. Białko ARF6 reguluje również tę maszynę aparatu kurczliwego odpowiedzialną za uwolnienie ektosomów. ARF6 kontroluje lokalizację kinazy lekkiego łańcucha miozyny (MLCK z ang. *Myosin Light-Chain Kinase*), poprzez aktywację ERK (z ang. *Extracellular signal-Regulated Kinases*) i fosfolipazy D (PLD z ang. *Phospholipase D*), prowadzącą do fosforylacji łańcucha lekkiego miozyny (MLC z ang. *Myosin Light Chain*) i aktywacji skurczu cytoszkieletu w rejonie pączkowania pęcherzyków [51].

1.3. Ciałka apoptotyczne

Ciała apoptotyczne stanowią grupę największych mikropęcherzyków rzędu wielkości 500-5000 nm, które powstają podczas zaprogramowanej śmierci komórki (apoptozy). W końcowych etapach apoptozy, zawartość komórki jest upakowywana w ciałkach apoptotycznych, które są uwalniane poprzez uwypuklenie błony komórkowej (z ang. *membrane blebbing*), a następnie pochłaniane przez komórki fagocytyjące [52]. Taka fragmentacja komórki do ciała apoptotycznego jest zaangażowana w usuwanie umierającej komórki [53]. Dodatkowo ciała apoptotyczne uczestniczą w komunikacji międzykomórkowej dostarczając ich zawartość do komórek biorcy [54,55]. Tworzenie ciałek apoptotycznych przez umierające komórki wpływa na regulację immunologiczną i odgrywa ważną rolę w stanach patologicznych, w tym autoimmunizacja i nowotwory [56].

1.4. Oddziaływania mikropęcherzyków z komórkami docelowym

Rola i funkcje mikropęcherzyków w procesach fizjologicznych i patologicznych są uzależnione od ich zdolności do oddziaływania z komórkami docelowymi, aby dostarczyć ich zawartość białek, lipidów i RNA (Ryc. 4.). Swoistość komórek docelowych dla wiązania egzosomów (lub innych mikropęcherzyków) najprawdopodobniej jest wyrażona przez cząsteczki adhezyjne t.j. integryny, które obecne są na powierzchni mikropęcherzyków. Dodatkowo wydaje się, że różnice w budowie egzosomalnych kompleksów tetraspaniny wpływają na wybór komórek docelowych w warunkach *in vitro* i *in vivo* [⁵⁷], prawdopodobnie poprzez modulowanie funkcji białek skojarzonych, w tym cząsteczek adhezyjnych (t.j. integryny) [⁵⁸].



Rysunek 4 Schemat transferu RNA oraz białek przy użyciu mikropęcherzyków. Przygotowane w oparciu o rysunek przygotowany przez G Raposo [1]. Białka związane z błoną (trójkąty) oraz przezbłonowe (prostokąty) i RNA (zakrzywione symbole) są selektywnie włączane

Po związaniu z komórkami docelowymi, mikropęcherzyki mogą pozostać stabilnie związane z błoną plazmatyczną lub dysocjować, bezpośrednio "zlewać się" z błoną plazmatyczną lub być internalizowane przez odrębne szlaki endocytarne (Ryc. 4). Po endocytozie mikropęcherzyki mogą połączyć się z endosomalną błoną ograniczającą lub zostać

ukierunkowane do lizosomów w celu degradacji. Wykrywanie fuzji małych mikropęcherzyków z błoną plazmową przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej w żywych komórkach jest ograniczone rozdzielczością i szybką dynamiką zdarzeń fuzji. Niemniej jednak bezpośrednie dowody fuzji egzosomów z docelowymi błonami komórkowymi otrzymano przez znakowanie egzosomów barwnikiem lipofilowym R18, w którym samowygaszanie jest łagodzone po rozcieńczeniu na skutek fuzji [⁵⁹], co objawia się wzrostem fluorescencji komórek docelowych. Badania Morelli, Barrčs i Tian dostarczyły dowodów na nagromadzenie przechwyconych mikropęcherzyków w przedziałach endocytarnych lub fagocytarnych, z wychwytem zależnym od cytoszkieletu aktynowego, aktywności 3-kinazy fosfatydyloinozytolu i funkcji dynaminy-2 [^{60, 61,62}].

2. Fibrynoliza

Fibrynoliza jest podstawowym procesem fizjologicznym prowadzącym do lizy skrzepu krwi poprzez rozpuszczenie włókien fibrynowych. Stan równowagi pomiędzy fibrynolizą a procesami krzepnięcia jest głównym elementem niezbędnym do utrzymania płynności krwi poprzez zapobieganie nadmiernemu tworzeniu skrzepów hemostatycznych i w konsekwencji zamykaniu naczyń.

Składniki układu fibrynolitycznego i produkty degradacji fibryny biorą udział w wielu procesach biologicznych, w tym w agregacji płytek krwi [63], angiogenezie [64], migracji komórek [65], owulacji [66] i przebudowie tkanki [67]. Fizjologiczna rola składników układu fibrynolitycznego zależy od ich pochodzenia (produkty degradacji fibryny) oraz lokalizacji (błona komórkowa) [68].

Kluczowym białkiem w fibrynolizie jest plazminogen - proenzym, który przekształca się w aktywną plazminę jako produkt końcowy systemu aktywacji plazminogenu. Układ ten składa się z szeregu proteaz serynowych, inhibitorów i kilku białek wiążących [69]. Plazmina wykazuje szeroki zakres aktywności proteolitycznych, celuje w fibrynogen i fibrynę, ale także w składniki macierzy zewnątrzkomórkowej (m.in. fibronektyna, trombospondyna, witronektyna), czynniki wzrostu (m.in. TGF- β , bFGF) odgrywające istotną rolę jako mediatory zapalenia, oraz białka układu wrodzonej odporności [70]. Ponadto plazmina aktywuje kilka proenzymów, takich jak pro-tPA (pro-tkankowy aktywator plazminogenu), pro-uPA (aktywator plazminogenu typu pro-urokinazy), plazminogen (autoaktywacja) i zymogeny metaloproteinazy (proMMP) [71,72,73].

Wewnątrznacyniowa aktywacja fibrynolizy jest przeprowadzana głównie przez tPA (tkankowy aktywator plazminogenu) zachodzi na powierzchni fibryny. Innym aktywatorem plazminogenu jest urokinaza (uPA) wytwarzana przez monocyty, makrofagi lub komórki nabłonka układu moczowego, która uczestniczy głównie w proteolizie pozanacyniowej [74]. Pula aktywnego enzymu jest również kontrolowana przez inhibitory aktywatora plazminogenu, takie jak PAI-1 i PAI-2 [73]. Plazmina jest hamowana wyłącznie przez dwa białka: α 2-antyplazminę i α 2-makroglobulinę [75].

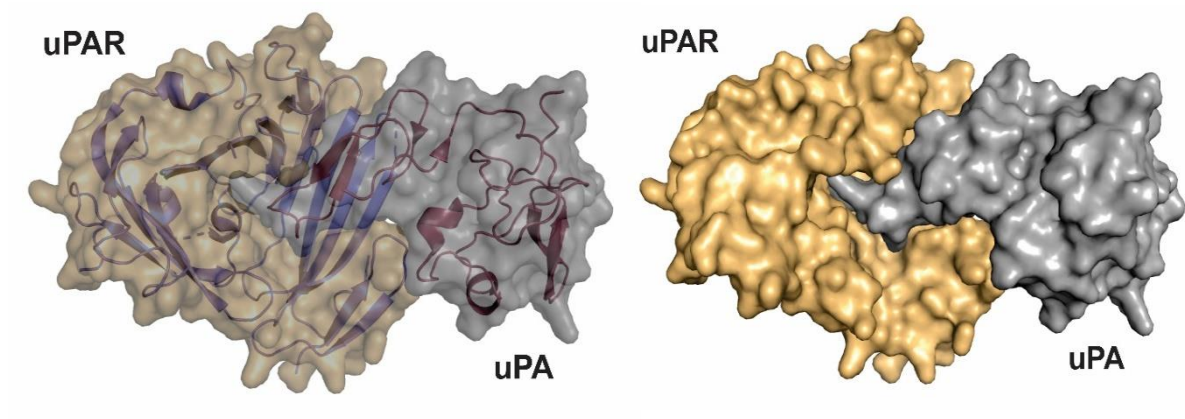
W warunkach fizjologicznych uPA jest syntetyzowany głównie przez komórki nabłonkowe, śródbłonkowe i mięśni gładkich, fibroblasty i monocyty/makrofagi. Wytwarzany

jest jako nieaktywny zymogen (pro-uPA) w postaci jednołańcuchowego aktywatora plazminogenu typu urokinazy (sc-uPA), mający niską aktywność proteolityczną, który po dwuetapowym cięciu proteolitycznym staje się aktywną formą dwułańcuchową (tc-uPA) [73]. Aktywność Sc-uPA jest konieczna do wytwarzania małych ilości plazminy, która hydrolizuje sc-uPA do tc-uPA. Obie formy uPA wykazują zwiększoną aktywność proteolityczną po związaniu ze specyficznym receptorem (uPAR), który jest obecny na powierzchni komórki [67, 76, 77]. Zwiększoną syntezę uPA obserwuje się w komórkach nowotworowych, w szczególności w nowotworach złośliwych szyjki macicy, jajników, tarczycy i piersi, co uważane jest za biomarker diagnostyczny i prognostyczny [73, 77, 78, 79, 80, 81]. W przeciwieństwie do tego, niedobór uPAR ma znaczący wpływ na akumulację fibryny w tkance, prowadząc do zmniejszenia ruchliwości komórek śródbłonna, upośledzonej angiogenezy, niedotlenienia kończyn oraz owrzodzeń [82, 83, 84].

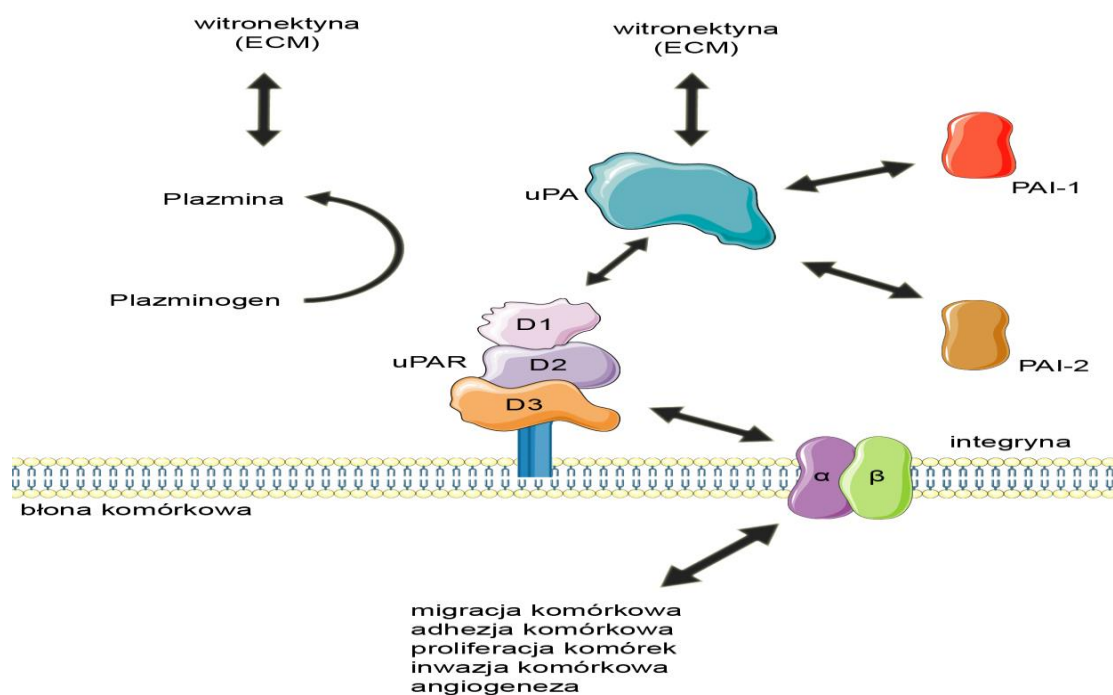
Natychmiast po aktywacji uPA (wolnej lub związanej z uPAR) enzym łączy się z PAI-1 (inhibitor 1 aktywatora plazminogenu 1), tworząc nieaktywny kompleks uPA/PAI-1/uPAR, który jest pobierany przez białko związane z receptorem LDL 1 (LRP-1), co stanowi mechanizm zależny od klatyny [85]. Wewnątrz komórki, resztkowy kompleks uPA / PAI-1 jest transportowany do lizosomów, gdzie ulega degradacji, jednak cząsteczka uPAR jest zawracana do pęcherzyków podobnych do makropinosomów i przedziałów endosomalnych, gdzie może być transportowana na powierzchnię komórki i wiązać inną urokinazę [86].

Receptor dla urokinazowego aktywatora plazminogenu, znany również jako CD87, jest glikoproteiną, przyłączoną do błony komórkowej przez kotwicę glikozylofosfatydilinozytolu (GPI) [87]. Ten jednołańcuchowy (313 a.a.) peptyd składa się z trzech domen o różnych funkcjach biologicznych: D1 – domena wiążąca N-końcowy fragment urokinazy (ATF), domeny D2 i D3 - kontrolujące oddziaływanie uPAR z witronektyną [88].

Krótki łańcuch aminokwasowy, region łącznikowy D1/D2 ma właściwości podobne do chemokin, gdy jest cięty przez MMP, plazminę, chymotrypsynę i uPA [73]. Ekspresja uPAR została zaobserwowana w większości prawidłowych komórek, jak również w komórkach nowotworowych [89, 90]. uPAR pośredniczy w wielu procesach komórkowych, takich jak angiogeneza, przerzuty, adhezja komórek, inwazja i zapalenie [71, 73, Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.].



Rysunek 5 Przestrzenny model uPAR z przyłączoną cząsteczką uPA, przygotowany w oparciu o strukturę krystaliczną określoną z rozdzielczością 1,9 Å (kod PDB: 2FD6).



Rysunek 6 Funkcjonalne interakcje uPAR-uPA w fizjologii komórki. Przygotowano w oparciu o rysunek wykonany przez M Durak-Kozica [91].

Dodatkowo, uPAR stymuluje aktywność promotora reagującego na TCF i transaktywację genów uPA i cykliny D-1, a także wykazano nadekspresję uPAR i uPA w blaszkach miażdżycowych. Inne dane wskazują, że VEGF (czynnik wzrostu śródbłonka naczyniowego) stymuluje ekspresję uPA przez indukcję przepuszczalności komórek śródbłonka w wyniku aktywacji systemu uPA/uPAR poprzez sygnalizację beta-kateniny. Co ciekawe,

przepuszczalność indukowana przez uPA jest szybka w porównaniu z dwustopniową przejściową przepuszczalnością wywołaną przez VEGF. W opóźnionej fazie dysfunkcji śródbłónka obserwowano podwyższenie ekspresji uPAR z jednoczesną translokacją beta-kateniny do jądra komórkowego i obniżeniem poziomu białka typowego dla złączy ścisłych - okludyny [92]. Mechanizmy odpowiedzialne za indukowaną przez VEGF przepuszczalność śródbłónka obejmują fenestrację z powodu przegrupowania VE-kadheryny, fosforylacji beta-kateniny, tyrozyny i cytoszkieletu aktynowego [93]. Wyniki te sugerują, że ścieżki u-PA / u-PAR i Wnt są ściśle powiązane w sposób nie do końca znany.

Badania przeprowadzone przez Stępień i wsp. wykazały, że uwalnianie zewnątrzkomórkowych pęcherzyki śródbłonkowych (EV) można uznać za cechę patologii naczyniowej [16]. Szczególnie populacja ektosomów jest bardzo aktywne w przenoszeniu czynników prokoagulacyjnych i fibrynolitycznych, w tym czynnika tkankowego (TF), fosfatydyloseryny lub uPAR [94,95,96]. Chociaż aktywność uPAR w dysfunkcji śródbłónka została wcześniej opisana i udokumentowano jej rolę w modulacji odpowiedzi angiogenetycznej mikropęcherzyków śródbłónka [97]. Komórki śródbłónka zapewniają powierzchnię katalityczną dla przekształcenia plazminogenu w plazminę przez ekspresję kompleksu uPA/uPAR, a tym samym zmniejszenie aktywności kinazy *in vivo* na dysfunkcyjnych komórkach śródbłónka przez uwalnianie MV zawierających uPAR, co zamienia wyściółkę naczyniową do patologicznego stanu prozakrzepowego [95]. Przeciwnie, wzrost rozpuszczalnego uPAR obecnego na MVs pochodzenia śródbłonkowego, przyczynia się do fibrynolitycznej i proangiogennej aktywności MV [97]. To wzajemne oddziaływanie MV-uPAR może wyjaśniać mechanizm molekularny związany ze zwiększonym ryzykiem powikłań naczyniowych u pacjentów z cukrzycą.

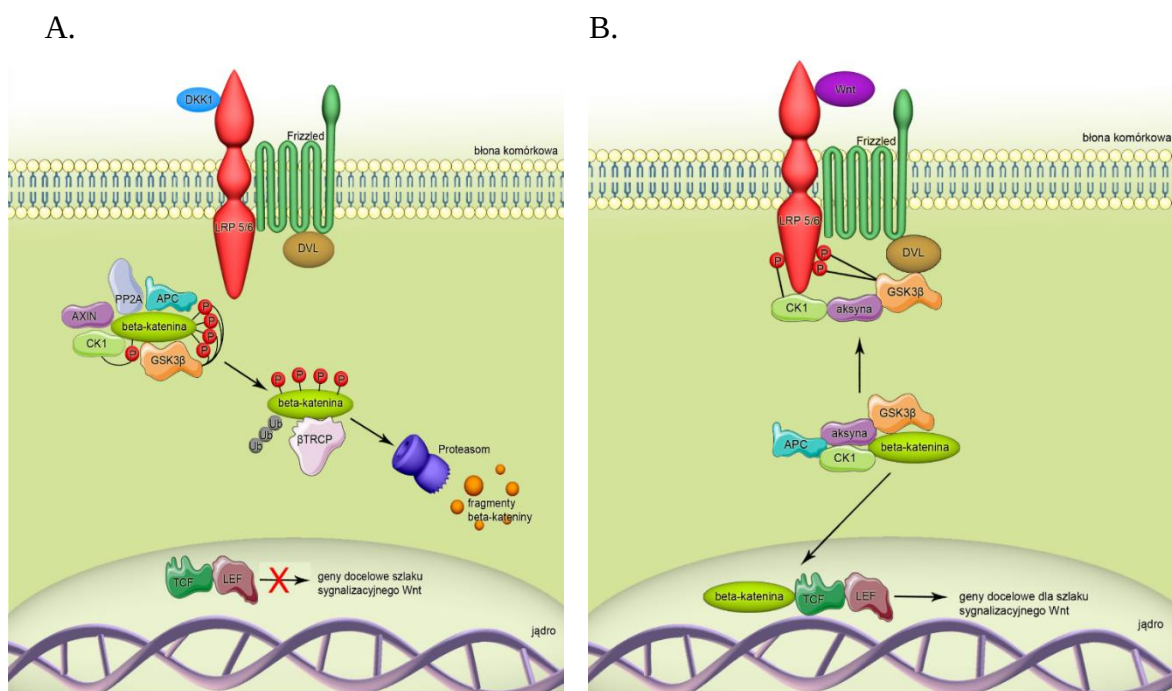
3. Szlak sygnalizacyjny Wnt

Szlak sygnalizacyjny Wnt jest szlakiem badanym od przeszło 30 lat. Białka zaangażowane w ten szlak są konserwatywne ewolucyjnie i obecne w komórkach różnych organizmów: od ukwiałów morskich po komórki ludzkie, sugerując, że ścieżki Wnt regulują podstawowe procesy komórkowe. Potwierdzają to badania wykazujące, że sygnalizacja Wnt reguluje rozwój embrionu poprzez modelowanie osi ciała, specjalizację komórek, migrację, polaryzację, proliferację i różnicowanie [98]. Mutacje występujące w obrębie białek Wnt prowadzą do nieprawidłowości w kościach [99], budowie serca i mięśni szkieletowych [100], mogą prowadzić do rozwoju raka, cukrzycy [101] lub otyłości [101].

Najważniejszymi komponentami, które inicjują kaskadę Wnt, są białka rodziny receptorów transbłonowych Fz (Frizzled). Jest to grupa ko-receptorów, najważniejsze z nich to białko związane z receptorem lipoproteinowym (LRP)-5/6, receptorowa kinaza tyrozynowa (Ryk) i transbłonowy receptor kinazy tyrozynowej (ROR2). Kluczowym białkiem aktywacji szlaku Wnt jest fosfoproteina cytoplazmatyczna Disheveled (Dvl), która działa jako molekularny przełącznik do wyboru, która ze ścieżek Wnt zostanie aktywowana. Zbudowana jest z trzech domen: DIX (końcowy aminowy), PDZ (centralny) i DEP (końcowy karboksylowy) [102].

Szlaki sygnalizacyjne Wnt można podzielić na dwie grupy: zależne od beta-kateniny (inna nazwa szlak kanoniczny) oraz niezależne od beta-kateniny (niekanoniczny szlak). W niniejszej pracy skupiono się na pierwszym rodzaju sygnalizacji Wnt.

Beta-katenina odgrywa dwie kluczowe role w komórkach, a mianowicie jest częścią układu kotwiczącego kadherynę pośredniczącego w interakcjach między komórkami oraz działa jako koaktywator transkrypcji w jądrze komórkowym. Podczas nieobecności ligandów Wnt, nadmiar beta-kateniny jest rozkładany przez kompleks białkowy składający się z aksyny, białka APC, fosfatazy białkowej 2A (PP2A), kinazy syntazy glikogenu 3 (GSK3) i kinazy kazeinowej 1 α (CK1 α) [103].



Rysunek 7 Szlak sygnalizacyjny Wnt podczas nieobecności liganda (A) oraz po przyłączeniu ligandu Wnt (B). Przygotowaniu w oparciu o rysunek wykonany przez M. Durak-Kozica [104].

Po związaniu ligandu Wnt z receptorem Fzd oraz jednoczesnej aktywacji koreceptora LRP 5/6 dochodzi do rekrutacji aksyny do błony plazmatycznej, co skutkuje rozpadem kompleksu degradacji beta-keniny. Dodatkowo, aktywowany Dvl dezaktywuje GSK-3. Dzięki inaktywacji aksyny oraz GSK-3, beta-kenina nie ulega degradacji, natomiast jest transportowana do jądra komórkowego, gdzie działa jako koaktywator dla czynników transkrypcyjnych LEF/TCF i aktywuje geny docelowe [105].

3.1. Rola szlaku sygnalizacyjnego Wnt zależnego od beta-keniny w śródbłonku.

Wysokie stężenia glukozy (10-20 mM) zakłócają połączenia przylegania śródbłonka przez dysocjacje kompleksu VE-kadheryny/beta-keniny poprzez aktywację szlaku Wnt/beta-kenina. W procesie tym pośredniczy fosforylacja tyrozyny VE-kadheryny przez PKC-β i MLC [106]. Blokowanie domeny E1E2 koreceptora LRP6, tłumi akumulację beta-keniny i nadekspresję VEGF, ICAM-1 i TNFα indukowanych przez wysokie stężenia glukozy w komórkach śródbłonka siatkówki. Sugeruje to, że przeciwciała blokujące szlak sygnalizacyjny Wnt zależny od beta-keniny mogą chronić przed przeciekaniem naczyń i zapaleniem siatkówki w modelach retinopatii cukrzycowej (DR) Przeciwciała te byłoby stosować jako środki terapeutyczne w połączeniu z innymi lekami antyangiogennymi.

Prawdopodobnym mechanizmem molekularnym będącym u podstaw tego jest regulacja ekspresji genów docelowych beta-kateniny i TCF/LEF, w tym myc i cycD1, które zwiększają żywotność, proliferację i migrację komórek naczyń [^{107,108,109}].

Inną ważną cząsteczką łączącą sygnalizację Wnt z długowiecznością komórek jest składnik białkowy kompleksu telomerazy, tj. odwrotna transkryptaza telomerazy (TERT), która zapewnia aktywność odwrotnej transkryptazy telomerazy i jest odpowiedzialna za syntezę DNA na końcach chromosomów. TERT jest niezbędny do utrzymania stabilności genomu i nieśmiertelności komórek. Duża aktywność telomerazy jest wykrywana w wielu nowotworach ludzkich, podczas gdy w komórkach somatycznych utrzymuje się na niskim poziomie [¹¹⁰]. Podczas gdy niekontrolowana żywotność komórek leży u podstaw wielu stanów związanych z cukrzycą, takich jak miażdżycy, retinopatia i nefropatia cukrzycowe, regulacja aktywności telomerazy jest atrakcyjnym podejściem w rozwoju nowych strategii terapeutycznych dla tych chorób. Model badawczy zastosowany w niniejszej pracy badawczej stanowią dwie unieśmiertelnione linie komórkowe śródbłona.

4. Teoretyczny model do analizy izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs) z wykorzystaniem technik wirowania różnicowego:

Wirowanie różnicowe jest techniką fizyczną, która znalazła szerokie zastosowanie w badaniach biologicznych do izolacji oraz oczyszczania różnych obiektów biologicznych, takich jak komórki, wirusy, organelle wewnątrzkomórkowe, białka i kwasy nukleinowe, które mogą być rozproszone w płynach ustrojowych i innych zawiesinach, takich jak np. lizaty komórkowe czy nadsącz z hodowli komórkowych. Na skutek wirowania cząstki, które mają wyższą gęstość od rozpuszczalnika opadają (sedymentują), a te o niższej gęstości niż gęstość ulegają flotacji [111].

Podczas wirowania z prędkością kątową ω na cząsteczkę o masie m działają trzy siły:

1. Siła odśrodkowa: $F = m\omega^2 R$
2. Tarcie dynamiczne (siła Stokesa): $T = -6\pi\eta r_c v$
3. Siła wyporu: $W = V\rho_{solv}a$

Warunek równowagi sił $F + W + T = 0$ prowadzi do następującego równania (równanie Svedberga):

$$v = \frac{dR}{dt} = g_{eff} \frac{d^2}{18\eta} (\rho - \rho_{solv}); \quad g_{eff} = \omega^2 R \quad (1)$$

gdzie:

- m - masa cząsteczki
- ω - prędkość kątowna wirowania
- R - odległość od osi obrotu
- η - lepkość dynamiczna medium
- r_c - promień cząsteczki (kuli)
- v - prędkość cząsteczki względem medium
- V - objętość cząsteczki
- ρ_{solv} - gęstość medium
- a - przyspieszenie odśrodkowe
- d - średnica aerodynamiczna cząsteczki $d = 2r_c$
- ρ - gęstość cząsteczki
- g_{eff} - siła odśrodkowa (przyspieszenie)

λ - współczynnik nachylenia

Równanie (1) można zapisać w następującej formie:

$$\frac{dR}{dt} = \lambda R; \lambda = s\omega^2; \quad s = \frac{d^2}{18\eta}(\rho - \rho_{solv}) \quad (2)$$

Współczynnik s jest stałą, inaczej współczynnikiem sedymentacji. Rozwiązanie równania (2) przedstawia się następująco:

$$R(t) = R(0)e^{\lambda t} \quad (3)$$

co wskazuje, że współrzędna promieniowa cząsteczki rośnie wykładniczo w czasie. Stała Svedberga jest miarą szybkości osadzania się cząstki się z roztworu lub zawiesiny pod indukowanym polem grawitacyjnym wirówki. Cząsteczka o współczynniku sedymentacji 1 S (10^{-13} s) będzie przemieszczać się z prędkością 1 mm na sekundę (10^{-6} m s $^{-1}$) pod wpływem przyspieszenia 10^6 g (10^7 m s $^{-2}$) [^{112}].

W próbkach biologicznych mieszanina cząstek stanowi zazwyczaj wieloskładnikową (heterogenną) mieszaninę cząstek, które różnią się pod względem wielkości i gęstości, a zatem także szybkości sedymentacji.

Wirowanie różnicowe polega na zastosowaniu kilku następujących po sobie cyklów wirowania o narastającym przyspieszeniu w celu selektywnej sedymentacji cząstek o różnych właściwościach (gęstość, średnica). Ponieważ następujące po sobie wirowania różnią się zastosowanym przyspieszeniem odśrodkowym oraz czasem trwania, kolejne cykle wirowania pozwalają na wyizolowanie coraz mniejszych obiektów z zawiesiny na drodze sedymentacji. Pozostałe w nadsączu (supernatancie) są mniejsze pod względem wielkości lub mają mniejszą gęstość. Mając na uwadze jednorodną dystrybucję wszystkich cząstek w próbówce wirowniczej oraz różne odległości cząstek od osi obrotu, należy liczyć się z jednoczesnym osadzaniem różnych, pod względem wielkości, cząsteczek w pelecie (małych i większych), i ich stratą podczas kolejnych powtarzających się cykli [^{111}].

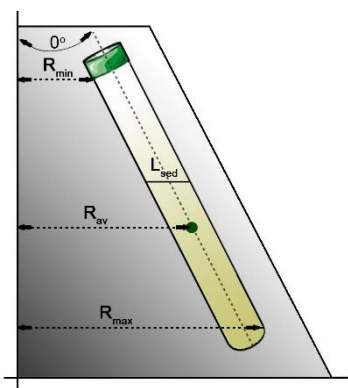
Wirowanie różnicowe jest wydajne tylko wówczas, gdy są sedymentowane cząsteczki różniące się znacznie współczynnikiem sedymentacji, natomiast w przypadku niewielkich

różnic we współczynniku sedimentacji rozdzielanych obiektów dochodzi do obniżenia efektywności wirowania [111].

Na potrzeby badań wykonanych do niniejszej pracy doktorskiej do analizy modelowania warunków izolacji mikropęcherzyków wykorzystano model opisany przez Mikhaila A. Livshitsa et al. [111]. Model Livshitsa uwzględnia następujące punkty zastosowane w równaniach i wykorzystane do dalszych rozważań: parametry geometryczne modelu wirnika, prędkość kątowna (ω), czas wirowania (t) oraz lepkość roztworu (η).

Wprowadzony przez Livshitsa model teoretyczny pozwala na ocenę proporcji osadzonych mikropęcherzyków o określonych rozmiarach (30-1000 nm) i gęstościach (1,08-1,15 g/cm³) [111]. Na podstawie równań (1 – 3) oraz zależności geometrycznych dla rotorów stałokątowych typu FA (ang. *fixed angle*) (Rys.1) w pracy [111] autorzy określili „wydajność” procesu wirowania *Pelleted* (d) tzn. ułamek cząstek o średnicy d , która po czasie t pokona odległość L_{sed} :

$$Pelleted(d) = \frac{2}{\pi} \left(\arcsin \frac{vt}{L_{sed}} + \frac{vt}{L_{sed}} \sqrt{1 - \left(\frac{vt}{L_{sed}} \right)^2} \right) \quad (4)$$



Rysunek 8 Schemat przedstawiający rozkład gęstości w zależności od promienia w rotorze stałokątowym (FA). Przygotowano w oparciu o rysunek wykonany przez MA Livshitsa [111].

W stałych, określonych warunkach wirowania (niezmienna prędkość obrotowa i skład medium) prędkość sedimentacji cząstek (p – cząsteczka wirowana) jest określona wyłącznie poprzez własności fizyczne cząstki. Cząstka o gęstości większej niż gęstość medium przesuwana się w kierunku zgodnym z kierunkiem działania siły odśrodkowej, podczas gdy cząstka lżejsza niż medium "unoszą się" w kierunku przeciwnym do siły odśrodkowej.

W przypadku zbliżonych gęstości, większe cząsteczki migrują szybciej [¹¹¹]. Zależność tą przedstawia równanie (2).

W badaniach biologicznych techniki wirowania stosuje się głównie do oddzielania różnych obiektów według ich wielkości (wirowanie różnicowe i strefowe) lub ich gęstość (wirowanie izopykniczne). W opracowanej na potrzeby niniejszej pracy doktorskiej procedurze izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EV) dokonano frakcjonowania cząstek (EV) według wielkości, stosując metodę wirowania różnicowego [¹¹¹].

Dokładny opis metody izolacji EV, pomiar ich wielkości i stężenia oraz analizę wyników opisano w części metodycznej w rozdziale 10.

5. Metoda Monte Carlo

Metoda Monte Carlo (MC) służy do modelowania wyników w procesach, których ostatecznego rezultatu nie można łatwo przewidzieć za pomocą obliczeń analitycznych. Symulacji MC można użyć do rozwiązania szeregu problemów, praktycznie w każdej dziedzinie: w naukach przyrodniczych, finansach czy inżynierii [113]. Modelowanie MC zastosowano w badaniach biologicznych i biofizycznych takich jak symulacja procesów biologicznych oraz sygnalizacja komórkowa [114].

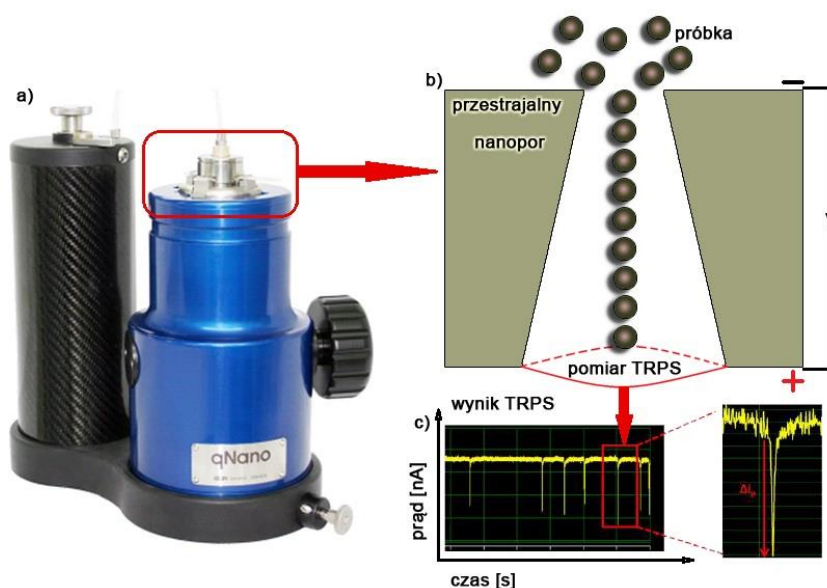
Istnieje wiele metod MC, ale wszystkie mają wspólną cechę polegającą na generowaniu liczb losowych w celu rozwiązania problemów o charakterze deterministycznym. Symulację MC przeprowadza się, zastępując konkretne parametry zmiennymi wylosowanymi z zadanego rozkładu prawdopodobieństwa. Następnie oblicza się wielokrotnie wyniki, za każdym razem przy użyciu innego zestawu wartości. Zastosowanie zmiennych losowych o określonym rozkładzie prawdopodobieństwa umożliwia bardziej realistyczne modelowanie rzeczywistych procesów od np. posługiwania się wyłącznie wartościami średnimi parametrów [113].

Pomysł wykorzystania procesu powtarzanego, losowego próbkowania do numerycznego oszacowania nieznanych parametrów został po raz pierwszy zaproponowany przez Stanisława Ulama, polskiego matematyka, który opracował algorytmy MC podczas prac nad Projektem Manhattan. Wykorzystał on narzędzia losowego próbkowania oraz statystyki do lepszego zrozumienia ryzyka związanego z procesami jądrowymi [115].

Metodę Monte Carlo zastosowano w pracy doktorskiej do określenia optymalnych warunków sekwencyjnego wirowania EV: ektosomów oraz egzosomów. Według równania (1) sedymentacja cząstek zależy od różnicy gęstości medium i EV oraz lepkości medium. O ile gęstość medium jest kontrolowana i praktycznie zawsze równa $\sim 1 \text{ g/cm}^3$ to gęstość samych EV może przyjmować wartości z przedziału $1.1 - 1.3 \text{ g/cm}^3$, a lepkość może być równa: $1.0 - 1.5 \text{ cP}$. Za pomocą metody MC można zbadać wpływ wspomnianych parametrów fizycznych na wydajność wirowania (4) w zależności od wybranej wartości względnej siły odśrodkowej RCF (z ang. *Relative Centrifugal Force*). Obliczenia przeprowadzono przy założeniu, że rozkłady prawdopodobieństwa gęstości EV oraz lepkości medium są jednorodne.

6. Technologia TRPS

Technologia TRPS (z ang. *Tunable Resistive Pulse Sensing*) jest nowoczesną metodą stosowaną do pomiaru wielkości, koncentracji oraz potencjału zeta (ζ) cząsteczek biologicznych oraz chemicznych zawieszonych w roztworze elektrolitu. W metodzie tej wykorzystuje się membrany poliuretanowe, które zawierają por o odpowiedniej średnicy. Stabilny prąd jonowy jest ustalany przez dwie elektrody Ag/AgCl, które są oddzielone membraną poliuretanową z nanoporem. Przyłożenie odpowiedniego ciśnienia zewnętrznego i napięcia na membranie z nanoporem umożliwia przejście cząsteczek przez por (Rys.9b). W momencie gdy mierzona cząsteczka przechodzi przez nanopor, czasowo go blokuje i prowadzi do spadku prądu rozpoznawanego jako tzw. „zdarzenie blokujące” (z ang. *blockade event*). Wielkość tej blokady (tzw. impuls rezystancyjny) jest proporcjonalna do objętości cząsteczki, natomiast liczba takich impulsów przypadająca na jednostkę czasu dostarcza informacji o stężeniu badanej próbki [116].



Rysunek 9 A.- Sprzęt qNano, B. - Schemat przejścia cząsteczek przez nanopor na skutek przyłożonego napięcia i ciśnienia, C. - Przykładowy wynik pomiaru, na podstawie którego można wyliczyć stężenie oraz średnice cząsteczek. Przygotowano w oparciu o rysunek wykonany przez ELCJ Blundell [116].

Opór w porze jest określany przez przewodnictwo elektrolitu i wielkość poru, co opisuje równanie poniżej:

$$R = \frac{4Lp}{\pi D_I D_S} \quad (5)$$

gdzie:

R- opór cylindryczny pora

L_p – długość poru

D_s – mała średnica nanoporu

D_l - duża średnica nanoporu

Ruch cząsteczek przez nanopor jest uzależniony od wielu czynników tj. ciśnienie, pole elektryczne, geometria nanoporu.

Częstotliwość pulsów J jest wyliczana w oparciu o teorię Nernsta-Plancka, która definiuje przepływ elektroosmotyczny, siły elektroforetyczne oraz przepływ napędzany ciśnieniem, jako komponenty J [116].

Częstotliwość pulsów J wyznaczoną dzięki metodzie TRPS można opisać następującym równaniem:

$$J = c_s * v_p \quad (6)$$

gdzie c_s oznacza stężenie cząsteczek, a v_p oznacza prędkość cząsteczki translokującej. v_p jest sumą prędkości przepływu (v_f), elektroforetycznej (v_e) i elektroosmotycznej (v_o), co można sumarycznie zapisać w formie: $v_p = v_e + v_f + v_o$.

v_p można opisać równaniem:

$$v_p = \frac{Q}{\pi \left(\frac{D_s}{2}\right)^2} + \frac{\varepsilon \zeta_{cząsteczki}}{\eta} E + \frac{\varepsilon \zeta_{pora}}{\eta} E \quad (7)$$

gdzie

$$Q = \frac{3\pi D_s^3 \Delta P}{128\eta \left(\frac{L}{D_l - D_s}\right)} \quad (8)$$

gdzie:

η - lepkość kinematyczna

ε - przenikalność roztworu

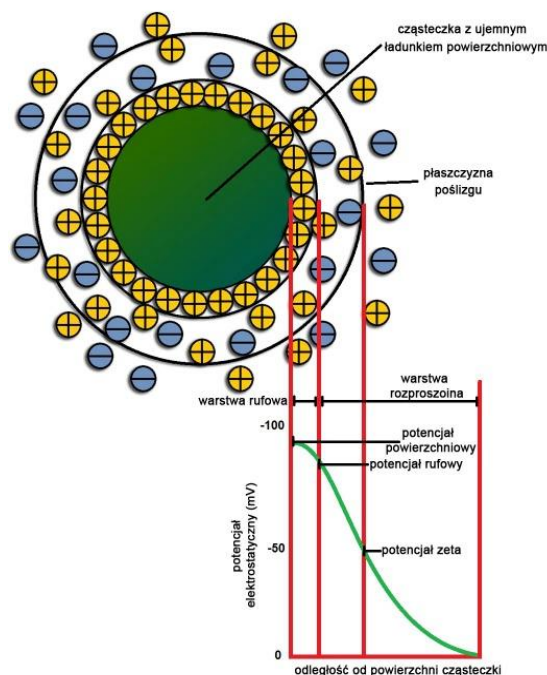
ζ - zeta potencjał

ΔP - ciśnienie na por

E-pole elektryczne

7. Zeta potencjał

Potencjał Zeta (ζ) (Ryc.10) jest to potencjał elektrostatyczny występujący na granicy między warstwą rozproszoną i zwartą warstwą (znaną również jako warstwa rufowa) układu koloidalnego. Potencjał ten jest związany z ładunkiem powierzchniowym cząsteczki i jest używany jako wskaźnik stabilności koloidu.



Rysunek 10 Schematyczna definicja potencjału zeta i podwójnej warstwy elektrycznej otaczającej cząstkę w roztworze elektrolitu. Przygotowaniu w oparciu o Malvern 2007.

Potencjał ζ charakteryzuje równanie Smoluchowskiego w formie:

$$\zeta = \frac{\eta \mu}{\epsilon} \quad (9)$$

gdzie:

ζ - potencjał zeta

η - lepkość dynamiczna płynu

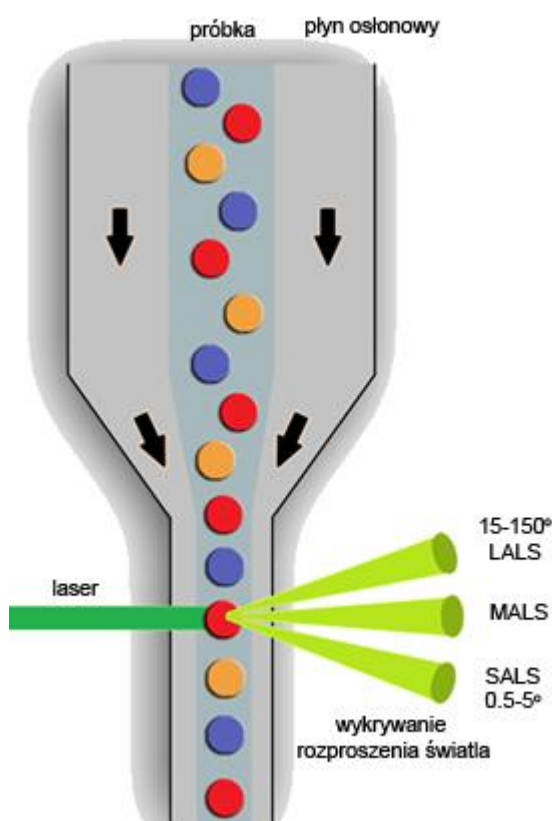
μ - ruchliwość cząstek

ϵ - stała dielektryczna

Równanie Smoluchowskiego pokazuje, że potencjał ζ cząsteczek można zmierzyć na podstawie prędkości, biorąc pod uwagę siły elektroosmotyczne oraz konwekcyjne, a także elektroforetyczną ruchliwość cząsteczki [¹¹⁶]. Ruchliwość elektroforetyczną cząstki naładowanej μ [$\text{m}^2 \text{s}^{-1} \text{V}^{-1}$] definiuje się jako szybkość migracji cząstki v [m s^{-1}] w jednostkowym polu elektrycznym o natężeniu E [V m^{-1}]: $\mu = v/E$. Szczegółowy opis wyznaczania potencjału ζ na podstawie równań 7 i 8 na podstawie pomiarów wykonanych przy pomocy metody TRPS przedstawiony jest w pracy Vogela i Wilmotta [¹¹⁷].

8. Cytometria przepływowa Apogee

Cytometria przepływowa jest powszechnie stosowaną metodą optyczną do analizy komórek, w której wykorzystuje się zjawisko rozpraszania światła i fluorescencji. Jednakże konwencjonalne cytometry przepływowe mają minimalny rozmiar detekcji wynoszący 200–500 nm, czyli ponad wielkość egzosomów, dlatego są nieskuteczne w odróżnianiu mikropęcherzyków, które się różnią o 100–200 nm lub mniej [118,119]. W konwencjonalnej cytometrii przepływowej sygnał tła jest często wysoki (rzędu wielkości < 200 nm), ze względu na zanieczyszczenia cząsteczkami buforu osłonowego.



Rysunek 11 Schemat działania cytometrii przepływowej. Opracowane w oparciu o rysunek wykonany przez Kibria G [120].

Próbka wyizolowanych, wyznakowanych mikropęcherzyków przepływa cienkim strumieniem z góry do strefy pomiaru i jest otoczona płynem osłonowym. Każdy pęcherzyk jest naświetlany zogniskowaną wiązką lasera, co skutkuje rozproszeniem światła oraz wzbudzeniem fluorochromów. Rozproszenie światła jest wykrywane przez trzy detektory: LALS (z ang. *Large Angle Light Scatter*, 15-150°), MALS (z ang. *Middle Angle Light Scatter*) oraz SALS (z ang. *Small Angle Light Scatter*, 0.5-5°).

9. Cel pracy doktorskiej

Mając na uwadze ograniczenia występujące podczas preparatyki izolacji homogennych subpopulacji mikropęcherzyków (EV), głównymi celami mojej pracy doktorskiej były:

1. Określenie parametrów wirowania różnicowego w celu wyizolowania dwóch czystych subpopulacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, w oparciu o model opracowany przez Mikhaila A. Livshitsa
2. Opisanie właściwości fizycznych wyizolowanych subpopulacji mikropęcherzyków.
3. Zbadanie właściwości biologicznych (fibrynolitycznych) wyizolowanych mikropęcherzyków w warunkach hiperglikemii, w tym zbadanie ich wpływu na ekspresję genów związanych z fibrynolizą oraz szlakiem sygnalizacyjnym Wnt

MATERIAŁY I METODY:

10. Materiały i metody:

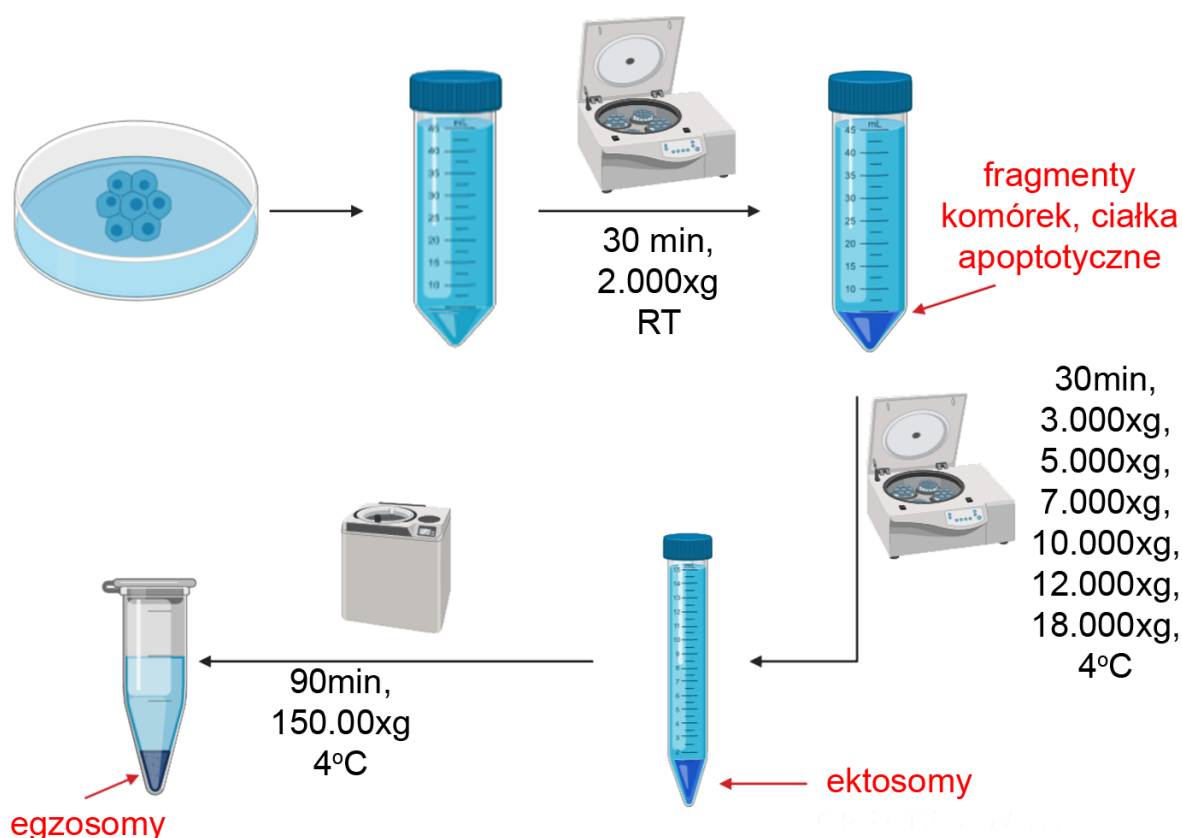
10.1. Hodowla komórek TIME oraz HUVEC.

Komórki TIME hodowano w pożywce podstawowej Vascular Cell Basal Medium (PCS-100-030, ATCC) wzbogaconej o penicylinę (100 U / ml), streptomycynę (100 U / ml), blastycydynę (12,5 µg / ml) i zestaw suplementów Microvascular Endothelial Cell Growth Kit-VEGF (ATCC PCS-110-041). Komórki HUVEC hodowano w pożywce podstawowej Vascular Cell Basal Medium (PCS-100-030, ATCC) wzbogaconej o penicylinę (100 U/ml), streptomycynę (100 U/ml) i zestaw suplementów Endothelial Cell Growth Kit-VEGF (ATCC PCS-100-041). Komórki hodowano w inkubatorze zapewniającym stałe warunki hodowli: 37 °C, 5% CO₂, wilgotność 95%.

Komórki inkubowane 48h do izolacji mikropęcherzyków hodowano z surowicą pozbawioną egzosomów (Gibco, A2720801) lub bez surowicy (test właściwości fibrynolitycznych mikropęcherzyków).

10.2. Przebieg doświadczenia do porównania uzyskanych wyników z modelem teoretyczny.

W celu porównania uzyskanych wyników z modelem teoretycznym przeprowadzono izolację mikropęcherzyków przy różnych prędkościach wirowania. Wstępnie medium odwirowano przez 30 minut przy 2.000 x g w celu usunięcia komórek oraz ciałek apoptotycznych. Uzyskane w ten sposób medium zawierało populację ektosomów oraz egzosomów. Ektosomy izolowano z medium hodowlanego poprzez wirowanie przy 3.000, 5.000, 7.000, 10.000, 12.000 i 18.000 x g przez 30minut w 4°C. Następnie zebrany nadsącz odwirowano przez 90 minut przy 150.000 x g w 4°C. Uzyskane osady mikropęcherzyków zawieszono w 100 µl PBS.



Rysunek 12 Schemat izolacji mikropęcherzyków do porównania z modelem teoretycznym.

W badaniach użyte zostały dwie różne wirówki wyposażone w następujące rotory stałokątowe: S140-AT oraz FA-45-24-11. Podstawowe parametry rotorów zawiera Tab. 2. W prezentowanym modelu obliczenia przeprowadzono w oparciu o równanie (4). Założono, że wartości gęstości mikropęcherzyków (ρ) oraz lepkości medium (η) zawierają się w przedziałach takich jak w Tab. 2. i mają rozkład jednorodny.

Wyizolowane populacje mikropęcherzyków rozcieńczono 2-krotnie i przefiltrowano przez filtr o średnicy pora 400 nm. W celu określenia rozkładu średnic mikropęcherzyków wykorzystano technologie TRPS (opis poniżej) na aparacie qNano (Izon Science Ltd.) wyposażonym w por NP100 (Izon Science Ltd.).

Modelową wydajność dla ektosomów $Pelleted_{Ekto}$ określono bezpośrednio z zależności (4), wykorzystując parametry zdefiniowane w Tabeli 2. Dla egzosomów wydajność jest równa:

$$Pelleted = Pelleted_{Egzo}(1 - Pelleted_{Ekto}) \quad (10)$$

Tabela 2 Parametry rotorów, wirowania oraz parametry fizyczne medium i mikro-pęcherzyków

	S140-AT	FA-45-24-11
$R_{\min}$ [cm]	3,26	7,58
$R_{\max}$ [cm]	4,79	11,07
θ [°]	35	45
Średnica probówki [cm]	0.75	0.85
ρ [g/cm ³]	1.1 ÷ 1.3*	1.1 ÷ 1.3*
ρ_{solv} [g/cm ³]	1.0#	1.0#
η [cP]	1.0 ÷ 1.5	1.0 ÷ 1.5
Względna siła odśrodkowa RCF	150000g	2000g ÷ 18000g
T [min]	90	30

* zdefiniowano na podstawie publikacji [18]

wartość lepkości medium zaokrąglono do 1cP w oparciu o dokonane pomiary lepkości

Wydajności wirowania, w oparciu o równanie (4), oraz modelowe rozkłady gęstości dla określonych wartości względnej siły odśrodkowej wyznaczono numerycznie w oparciu o załączony w załączniku 1 program w języku Fortran. Rozkłady gęstości obliczane są na podstawie wyników pomiarów q-Nano dla wstępnie odwirowanych mikropęcherzyków (Rys. 11B). Program generuje wyniki dla wylosowanych, z wyspecyfikowanych przedziałów (Tab. 2), wartości gęstości mikropęcherzyków oraz lepkości medium. W obliczeniach zastosowano generator liczb losowych o rozkładzie jednorodnym. Tekstowe pliki wynikowe zawierają wartości: wydajności wirowania, rozkłady gęstości, $d_{\text{cut of}}$ oraz wylosowane gęstości i lepkości użyte w obliczeniach. Na podstawie tych plików wyniki przedstawiono graficznie przy pomocy programu Grapher 11.

10.3. Izolacja EV.

Subkonfluentne hodowle komórek TIME i HUVEC inkubowano przez 48h w medium hodowlanym z dodatkiem 2% surowicy pozbawionej egzosomów. Następnie medium

hodowlane zebrano do falkonów i odwirowano przez 30 minut przy 2.000 x g w celu usunięcia komórek oraz ciałek apoptotycznych. Wstępnie odwirowane medium zwirowano przez 30 minut przy 18.000xg w celu uzyskania peletu ektosomów. Zebrany nadsącz odwirowano przez 90 minut przy 150.000 x g w 4°C w celu uzyskania peletu egzosomów. Powstałe osady ektosomów i egzosomów zawieszono w 100 µl PBS.

10.4. Pomiar wielkości oraz koncentracji EV przy użyciu metody qNano.

Rozkład wielkości i stężenie EV zmierzono za pomocą technologii TRPS przy użyciu systemu qNano (Izon Science Ltd., Oxford, UK). Przyrząd skalibrowano przy użyciu kulek kalibracyjnych CPC100 i CPC200 (Izon Science) zgodnie z instrukcjami producenta. Egzosomy mierzono stosując nanopor NP100 (zakres analizy 50-330 nm; Izon Science) z ciśnieniem 5 mbar. Ektosomy mierzono stosując nanopor NP200 (zakres analizy 85-500 nm; Izon Science) z ciśnieniem 1 mbar. Ustawiono napięcie i rozciąganie, aby uzyskać stabilny prąd między 100-120 nA. Próbkę analizowano przez 3 minuty bądź do czasu wykonania pomiaru na 500 obiektach. Przetwarzanie i analiza danych zostały przygotowane na oprogramowaniu Izon Control Suite v2.2 (Izon Science).

10.5. Pomiar Zeta-potencjału mikropęcherzyków przy użyciu metody qNano.

W celu zmierzenia z ζ potencjału dla ektosomów (izolowane przy 18 000xg) oraz egzosomów skalibrowano nanopor przy trzech różnych napięciach (V1,V2,V3) oraz dwóch różnych ciśnieniach (P1,P2). Próbkę mikropęcherzyków zmierzono przy napięciu V2 i ciśnieniu P2.

Tabela 3 Wartość ciśnienia i napięcia przy przeprowadzonej kalibracji nanoporu.

Kalibracja	Ciśnienie [mbar]	Napięcie [mV]
V1P2	0,1	0,94
V1P1	1,1	0,94
V2P1	1,1	0,76
V3P1	1,1	0,60

10.6. Wizualizacja mikropęcherzyków przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM).

Pelet egzosomów i ektosomów utrwalono 2,5% aldehydem glutarowym (Sigma Aldrich, nr kat. G5882) w 0,1 M buforze kakodylowym (Sigma Aldrich, nr kat. C0250), a następnie utrwalano przez 1 godzinę w 1% roztworze tlenku osmu. Próbki następnie odwodniono, przepuszczając przez stopniowaną serię etanolu i zatopiono w żywicy epoksydowej PolyBed 812 w 68 °C (Polyscience, Inc., nr kat. 08791-500). Ultracienkie (65-70 nm) skrawki umieszczono na siatkach miedzianych o wielkości 300 oczek pokrytych folią formvar. Skrawki kontrastowano stosując octan uranylu i cytrynian ołowiu. Obserwację przeprowadzono na mikroskopie elektronowym (JEOL JEM2100HT, Jeol Ltd, Tokio, Japonia) przy napięciu przyspieszającym równym 80 kV. Średnice mikropęcherzyków wyznaczono manualnie w programie Fiji.

10.7. Analiza właściwości fibrynolitycznych wyizolowanych mikropęcherzyków.

Próbki krwi pełnej pobranej na antykoagulant – cytrynian sodu- pobrano od ochotników i dwukrotnie odwirowano przy $2.500 \times g$ przez 15 minut, aby uzyskać osocze ubogie w płytki krwi (PPP). Osocze zebrano i przechowywano w -4° C. Próbkę osocza o objętości 25 μ l zmieszano z 75 μ l buforu (0,05 mol/l Tris-HCl, 0,1 mol/l NaCl, pH 7,4) i 50 μ l mieszaniny aktywacyjnej (końcowe stężenia: 0,01 U/ml trombiny i 7,5 mmol/L Ca^{2+}). Absorbancję przy długości fali 340nm odczytywano co 2 minuty przez 2 godziny w 37°C za pomocą czytnika mikropłytek BIO-TEK ELx-808. Następnie dodano 12 μ g egzosomów lub ektosomów (izolowanych z płytki 6-studzienkowej) do nowo utworzonego skrzepu osocza, z dodatkiem inhibitorów: kwasu ϵ -aminokapronowego (100 mM; Sigma-Aldrich) lub aprotyniny (2,2 mM; Sigma Aldrich), lub bez nich. W celu uzyskania kontroli pozytywnej, do skrzepu osocza dodano uPA (100 jednostek, uPA z ECM600, Sigma Aldrich) zamiast egzosomów i ektosomów. Gęstość optyczną (OD) mierzono przy 350 nm co 20 minut przez 24 godziny w 37°C za pomocą czytnika mikropłytek BIO-TEK ELx-808.

Procent retencji skrzepu obliczono stosując następującą zależność:

$$100 - \left(\frac{OD_{po\ 0h} - OD_{po\ 24h}}{OD_{po\ 0h} - OD_{osocze}} \right) * 100 \quad (11)$$

OD osocze odnosi się do kontroli zawierającej tylko ludzkie osocze.

10.8. Analiza aktywności urokinazy (uPA) w EV.

Aktywność uPA mierzono w ektosomach i egzosomach izolowanych hodowli komórek wykonanych na płytce 6-studzienkowej po 48 godzinach inkubacji z 5 mM D-glukozą, 25 mM D-glukozą lub 5 mM D-glukozą z 5 mM L-glukozą przy użyciu komercyjnie dostępnego zestawu uPA Activity Assay Kit (Sigma Aldrich, ECM600).

10.9. Analiza ekspresji uPAR oraz beta-kateniny w lizatach komórkowych oraz EV zmierzona metodą western blot.

Ekstrakty białkowe z komórek (15µg białka), ektosomów i egzosomów (oba 10 µg białka) rozcieńczono w stosunku 1: 1 buforem Laemmli'ego (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 1 mM EDTA, 10% glicerolu, 2% SDS, 0,025% błękitu bromofenolowego z 5% β-merkaptioetanolu) i rozdzielono metodą elektroforezy SDS-PAGE przy użyciu 10% żeli białkowych Mini-PROTEAN TGX (BioRad) i przeniesiono na membrany PVDF przy użyciu aparatu Bio-Rad Mini-Protean 3 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Bloty blokowano przez noc w 1% BSA w buforze TBS/Tween (0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,1% Tween 20, pH 7,5) i inkubowano przez 1 godzinę z pierwszorzędowymi przeciwciałami swoistymi wobec uPAR (Santa Cruz, Sc-376494) oraz beta-kateninie (Cell Signalling, 9562). Przeciwciała 1 rzędowe rozcieńczono w stosunku 1:500 w 1% BSA w buforze TBS/Tween. Po inkubacji z pierwszorzędowym przeciwciałem błony przemyto trzy razy buforem Tween/TBS i inkubowano przez 1 godzinę z odpowiednim skoniugowanym z HRP drugorzędowym przeciwciałem (Anti-Mouse lub anti-rabbit IgG-POD, Lumi-Light kit Roche) rozcieńczonym 1: 250 w 1 % BSA w buforze TBS / Tween. Po tym błony inkubacyjne przemyto 3x w buforze TBS/Tween i 3x w buforze TBS (0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,1%). Wszystkie przeciwciała stosowano zgodnie z protokołami producenta.

Immunopozytywne prążki wizualizowano stosując Lumi-light Reagent (Roche) i ChemiDoc™ XRS + System (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Względne poziomy ekspresji białka określono za pomocą oprogramowania ImageLab (BioRad). Poszczególne poziomy białka normalizowano do całkowitej intensywności pasm na danej linii rozdziału w żelu po elektroforezie.

10.10. Analiza ekspresji markerów powierzchniowych EV przy użyciu cytometrii przepływowej.

Markery powierzchniowe EV wyizolowanych z komórek TIME i HUVEC wykrywano za pomocą cytometru przepływowego Micro Apogee A50 (ApogeeFlow Systems, HemelHempstead, Wielka Brytania) po wybarwieniu przeciwciałami: anti-CD81 (BioLegend, ABIN2472719), anti-CD63 (BioLegend, ABIN1998604), anti-CD151 (BioLegend, ABIN2478583), anti-Wnt3a (BioLegend, ABIN4219643) i aneksyna V (Invitrogen, A35122) z buforem wiążącym aneksynę (Invitrogen, V13246). Jako kontrolę izotopową zastosowano przeciwciała: mysie IgG1 FITC / IgG1 PE / IgG1 PE-Cy5 IsotypeCtrl Cocktail (BioLegend, 319201) i FITC mysie IgG2b Isotype Ctrl Antibody (BioLegend, 401206). Wszystkie przeciwciała wirowano przez 5 minut przy 18.890 x g w celu usunięcia agregatów barwników. Ektosomy i egzosomy zawieszone w PBS (Sigma) inkubowano z wybranymi przeciwciałami przez 30 minut w ciemności. Procent pozytywnych zdarzeń (ROI % of event) obliczono za pomocą oprogramowania Apogee Histogram (ApogeeFlow Systems).

10.11. Wizualizacja internalizacji EV przy użyciu mikroskopii konfokalnej.

Mikropęcherzyki wybarwiono PKH26 (Sigma, PKH26GL) zgodnie z procedurą opisaną w publikacji Durak-Kozica M et al. [121]. Do peletu mikropęcherzyków (populacja pęcherzyków po wirowaniu 150.000 x g, z ominięciem etapu 18.000 x g) dodano 0,1 µl PKH26 i 49,9 µl rozcieńczalnika C, i inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Jako kontrolę negatywną zastosowano próbkę bez mikropęcherzyków, w celu określenia przeniesienia barwnika PKH26. Po inkubacji z barwnikiem, próbki zablokowano 50 µl 1% BSA rozcieńczonym w 900 µl PBS i ultrawirowano przez 90 minut przy 150.000 x g w 4°C. Po tym etapie supernatant usunięto i osad mikropęcherzyków został przemyty w 1 ml PBS i ponownie ultrawirowany. Osad zawierający mikropęcherzyki wyznakowane PKH26 ponownie zawieszono w 1 ml pożywki do hodowli komórkowej.

Do badań internalizacji mikropęcherzyków, komórki TIME i HUVEC hodowano w szalkach ze szklanym dnem do osiągnięcia 50% konfluencji. Pożywkę zawierającą mikropęcherzyki dodano do komórek na 24 godziny inkubacji. Hodowle następnie przemyto 3 razy PBS i utrwalono zimnym (-20°C) acetonem przez 5 minut w - 20° C. Barwienie DAPI

(Sigma, D9542) zastosowano do wizualizacji jąder. Internalizację EV obserwowano i rejestrowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM 710 z obiektywem Plan-Apochromat 40 x NA 1.4 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) z imersją olejową. Do wzbudzenia fluorescencji stosowano lasery 405 nm (DAPI) i 561 nm (PKH26). Obrazy zbierano przy wielkości voksela $0,209 \times 0,209 \times 0,436 \mu\text{m}$, odpowiednio w bocznych i osiowym kierunkach, z osiowym zakresem akwizycji ustawionym na pokrycie całej komórki w pojedynczym obrazie (9,16 – 23,11 μm).

10.12. Wizualizacja uPAR i beta-kateniny w komórkach przy użyciu mikroskopii fluorescencyjnej.

Komórki wysiewano na szalki ze szklanym dnem w liczbie 600.000 na szkiełko. Następnie po inkubacji z D-glukozą lub/i L-glukozą, komórki przepłukano 3-krotnie PBS z jonami Ca^{2+} i Mg^{2+} . Komórki utrwalano zimnym (4°C) acetonem przez 3 minuty w temperaturze 4°C . Następnie komórki przepłukano 3-krotnie PBS-em. Niespecyficzne wiązania zablokowano poprzez inkubację przez 20 minut 0,1% BSA. Po inkubacji komórki przepłukano 3-krotnie PBS-em. Na szkiełko nakropiono po 20 μl przeciwciała I rzędowego anti-uPAR (Santa Cruz, sc-376494) (rozcieńczenie 1:500) i anti-beta-katenina (Sigma, C2206) (rozcieńczenie 1:2000). Inkubacja w komorze wilgotnościowej przez całą noc (temperatura 4°C). Po inkubacji z przeciwciałami pierwszorzędowymi komórki przepłukano 3-krotnie PBS. Następnie na szkiełko nakropiono po 20 μl przeciwciała II rzędowego sc-2780 (Santa Cruz) i sc-2010 (Santa Cruz). Oba przeciwciała rozcieńczono w stosunku 1:400 w PBS. Inkubację przeprowadzono w komorze wilgotnościowej przez 45 minut (temperatura 37°C), następnie komórki przepłukano 3-krotnie PBS. Cytoszkielek wybarwiono roztworem falloidyny Alexa Fluor 488 poprzez 30-minutową inkubację. Po inkubacji komórki przepłukano PBS i wybarwiono jądra komórkowe poprzez 15-minutową inkubację z roztworem DAPI. Po inkubacji komórki przepłukano 4-krotnie PBS po 5 minut na platformie bujanej. Wybarwione komórki umieszczono w PBS. Preparaty oglądano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Zeiss Axio Observer.Z1.

10.13. Analiza ekspresji uPAR, beta-kateniny, LEF1, RUNX w komórkach przy użyciu metody qPCR.

Izolację całkowitego RNA i syntezę cDNA przeprowadzono stosując odpowiednio zestawy Agilent Total RNA MiniPrep Kit oraz Agilent Affinity Script cDNA Synthesis Kit zgodnie z protokołami producenta. Amplifikacje przeprowadzono przy użyciu termocyklera (BioRad) i starterów TaqMan (Hs00958880_m1, Hs00355045_m1, Hs01547250_m1, Hs01047719_m1, Hs02558380_s1, Hs01047973_m1, Hs01091094_m1) w połączeniu z TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific), zgodnie z instrukcją producenta. Względna ekspresja genów została znormalizowana poziomowi ekspresji endogennego genu odniesienia GAPDH (Thermofisher, Human GAPD Endogenous Control, numer 4333764T) (ΔCq) i przekształcona do względnej ekspresji przy użyciu metody $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Wyniki są wyrażone jako wartości względne (RQ).

10.14. Analiza statystyczna.

Program OriginPro 2017 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) został wykorzystany do przeprowadzenia analizy statystycznej oraz przygotowania wykresów. Wykresy przedstawiają wartość średnią $\pm$ odchylenie standardowe. Wyniki opracowano statystycznie poprzez zastosowanie jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA z testem post-hoc Tukey. Wartość $p < 0,05$ była uznawana za istotną statystycznie (*).

WYNIKI

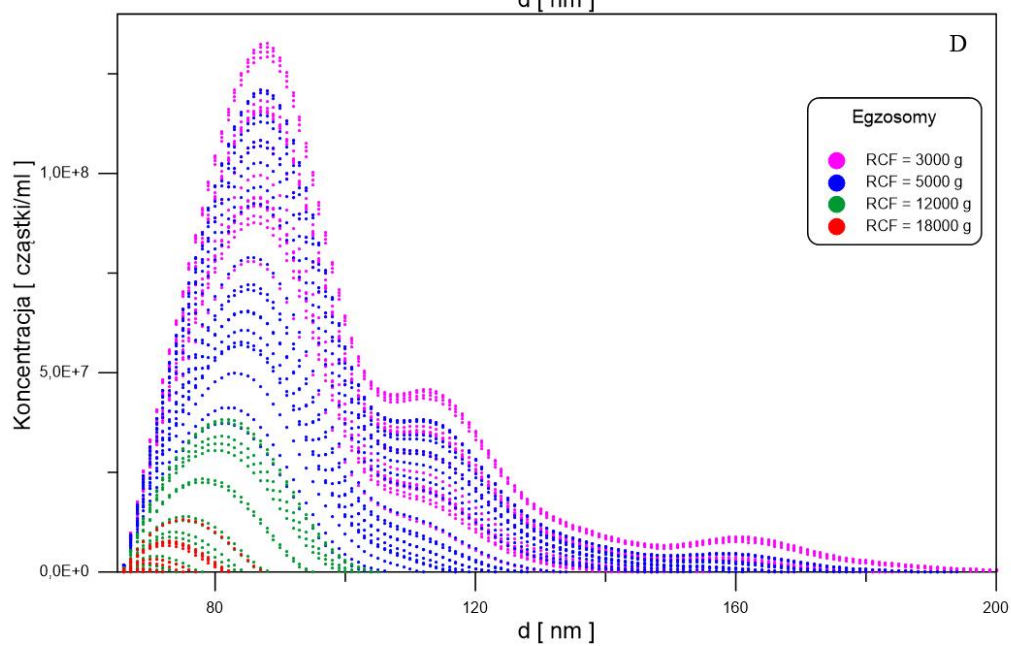
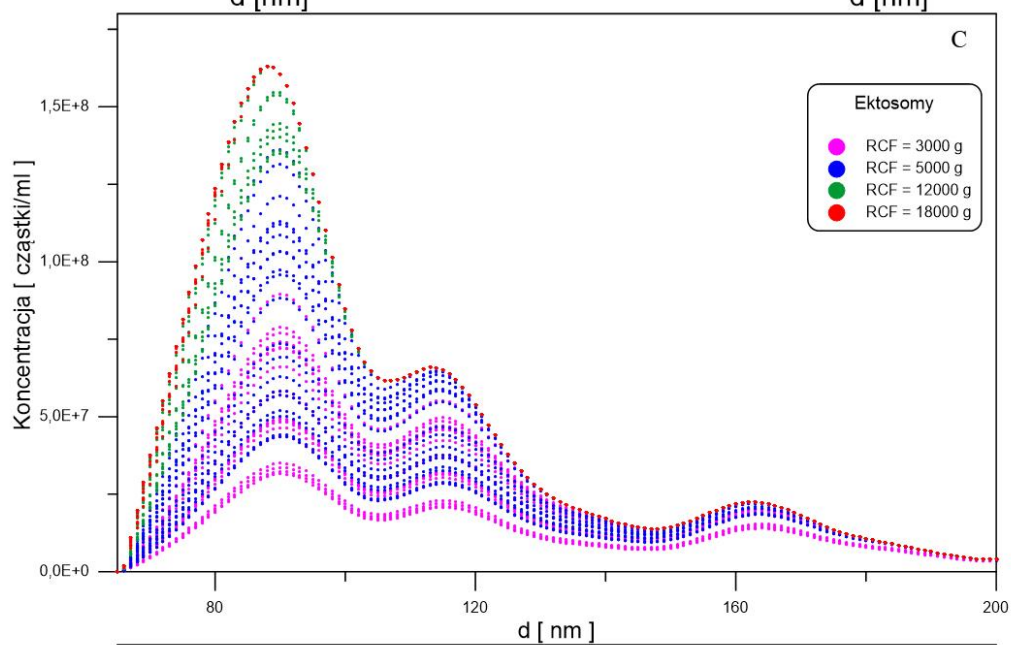
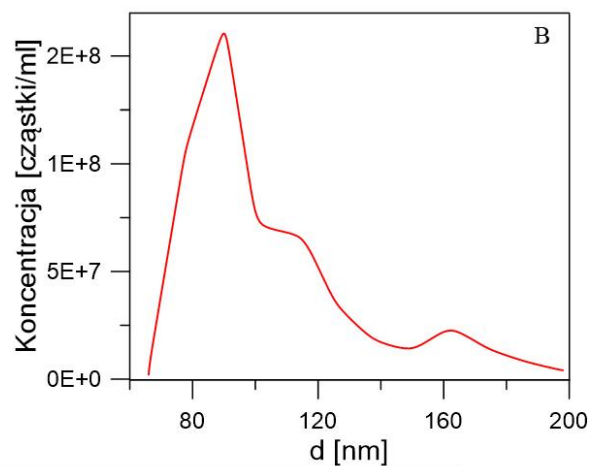
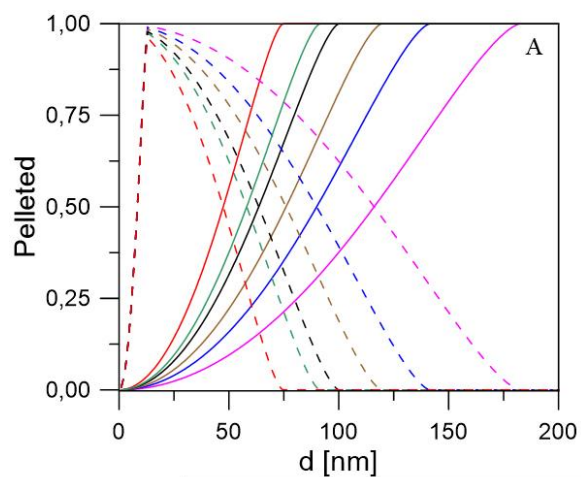
11. Porównanie wyników z doświadczeń z modelem teoretycznym

11.1. Opracowanie modelu teoretycznego oraz weryfikacja modelu teoretycznego za pomocą eksperymentu zliczania wielkości mikropęcherzyków.

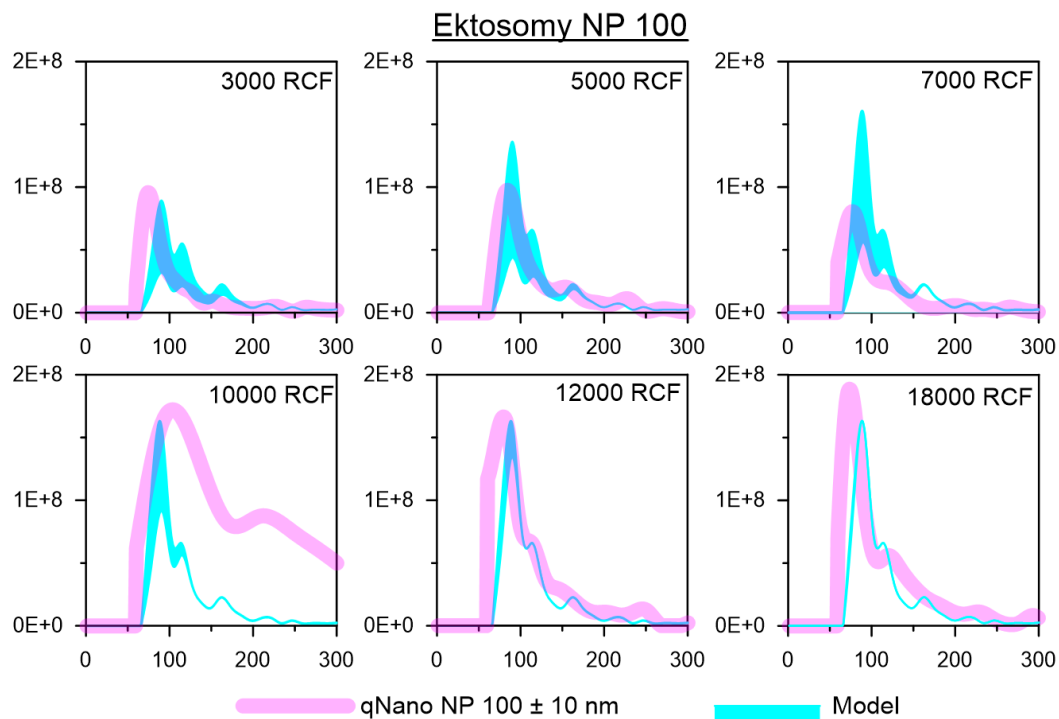
Wyniki obliczeń wydajności dla danej wartości gęstości mikropęcherzyków (ektosomów i egzosomów) $1,15 \text{ g/cm}^3$ oraz lepkości rozpuszczalnika $1,03 \text{ cP}$ dla ektosomów i egzosomów przedstawia Ryc. 13A. Najwyższą wydajność osadzania się ektosomów możemy zaobserwować podczas wirowania przy $18.000 \times g$, jednocześnie obserwując największe odcięcie wielkości dla egzosomów.

Na Ryc. 13B przedstawiony jest wyjściowy rozkład średnic mikropęcherzyków po wirowaniu przy $2.000 \times g$ zmierzony przy użyciu technologii TRPS. Ryciny 13C i 13D obrazują wpływ zmian gęstości i lepkości na wydajność wirowania. Wartości gęstości i lepkości losowane były z przedziałów z Tabeli 2, przy założeniu, że zarówno wartości gęstości jak i lepkości pochodzą z rozkładu jednorodnego. Na rycinie 13C można zauważyć, że wirowanie przy $18.000 \times g$ jest wartością graniczną powyżej której wydajność sedymentacji ektosomów nie zależy od właściwości fizycznych pęcherzyków (gęstość) oraz rozpuszczalnika (lepkość). Wirowanie powyżej $18.000 \times g$ wiązałoby się z silną redukcją koncentracji wyizolowanych egzosomów, jednakże można zauważyć, iż przy tych parametrach wirowania powinno się uzyskać najczystsza populację egzosomów poprzez odcięcie wielkości pęcherzyków powyżej 100 nm .

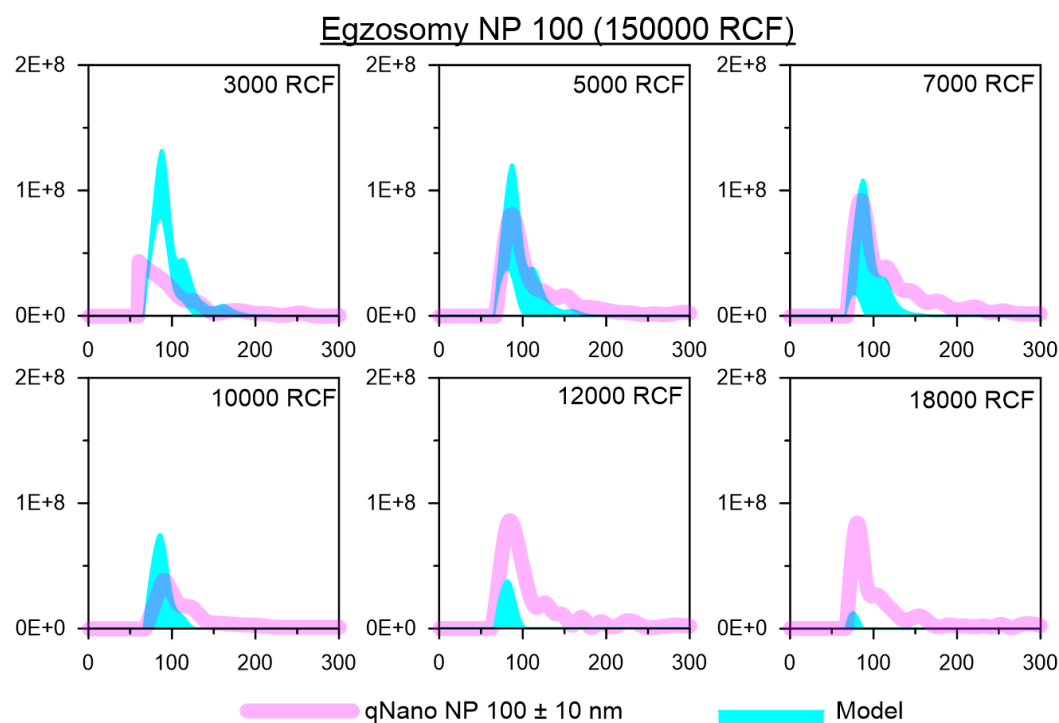
Ryciny 14 i 15 przedstawiają porównanie przewidywań teoretycznych z pomiarami średnic mikropęcherzyków wykonanych przy pomocy metody TRPS. Błąd pomiarowy określenia średnicy EV przy pomocy metody qNano równy $\pm 10 \text{ nm}$, określono na podstawie danych zawartych w pracy [122]. Dla obliczeń teoretycznych na rysunkach przedstawiono zakres wartości koncentracji obliczonych w losowaniach. Rycina 14 pokazuje, że wirowanie przy $12.000 \times g$ i $18.000 \times g$ pozwala uzyskać populację ektosomów najbardziej zbliżoną do modelu teoretycznego. Podczas gdy na rycinie 15 można zauważyć, że populacje egzosomów wyizolowane z nadsączy z wirowań przy niższych wartościach $\times g$ ($5.000 - 10.000 \times g$) są bardziej zbliżone do wyników uzyskanych z modelu teoretycznego. Na podstawie wyników zaprezentowanych w tej części pracy doktorskiej, zdecydowałam się wirować ektosomy do pozostałej części badań przy wartości $18.000 \times g$.



Rysunek 13A – Wydajności wirowania obliczone na podstawie modelu dla ekzosomów (linia ciągła) i egzozomów (linia przerywana) obliczone z zależności (4) i (5) na podstawie danych zawartych w Tab.2, B – wyjściowy rozkład koncentracji mikropęcherzyków wyznaczony dzięki pomiarom qNano, C i D przewidywane na podstawie modelu rozkłady koncentracji ekzosomów i egzozomów. Obszary dla poszczególnych wartości względnej siły odśrodkowej zawarte są pomiędzy najwyższym i najniższym z zaznaczonych punktów pomiarowych.



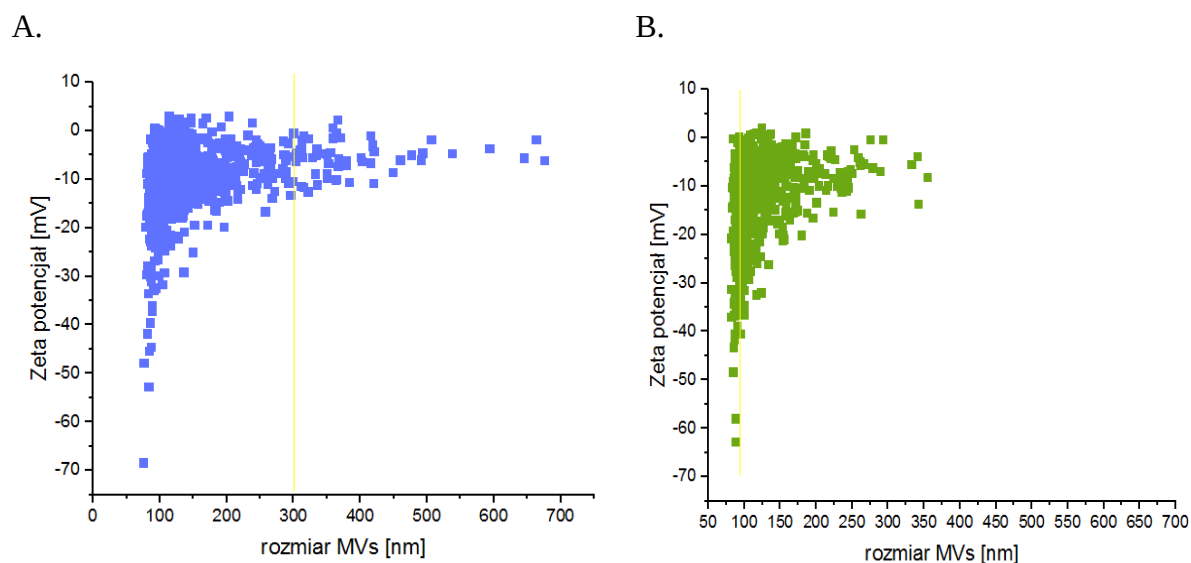
Rysunek 14 Porównanie wyników modelowych z pomiarami qNano (TRPS) dla ekzosomów. Błąd pomiarowy przedstawiony na rysunku wynosi ± 10 nm.



Rysunek 15 Porównanie wyników modelowych z pomiarami qNano (TRPS) dla egzosomów. Błąd pomiarowy oszacowano na ± 10 nm.

11.2. Pomiar Zeta-potencjału ektosomów oraz egzosomów wyizolowanych z komórek TIME.

Zmierzony ζ -potencjał dla ektosomów wynosił $-9,3 \pm 0,7\text{mV}$, a dla egzosomów $-11,35 \pm 1,9\text{mV}$ [Ryc.16].



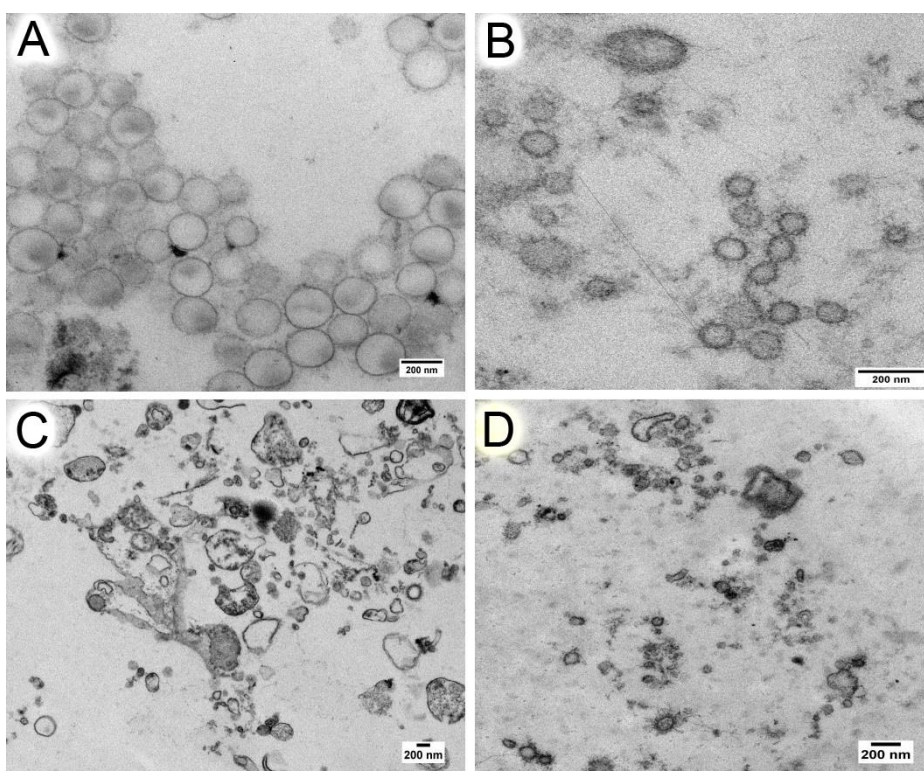
Rysunek 16 Zależność wielkości cząsteczek od ζ -potencjału. A. Ektosomy, B. Egzosomy.

Na żółto zaznaczono graniczną maksymalną wartość mikropęcherzyków wyznaczoną w modelu teoretycznym. Średnia wartość ζ -potencjału po uwzględnieniu tej informacji ulega zmianie i dla egzosomów wynosi $-17,05 \pm 0,79\text{mV}$ a dla ektosomów $-9,53 \pm 0,52\text{mV}$.

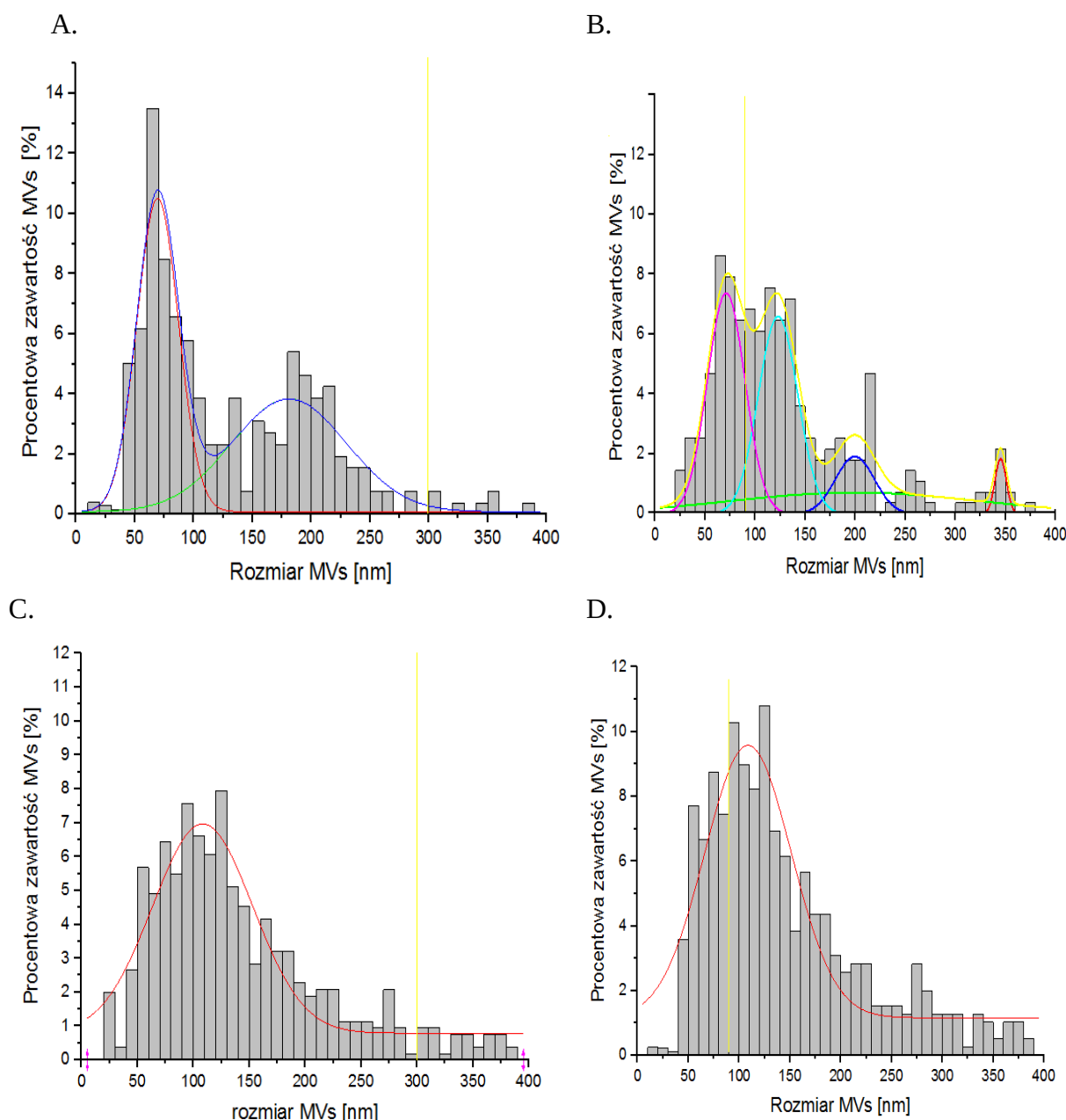
12. Charakterystyka mikropęcherzyków

12.1. Zobrazowanie mikropęcherzyków przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego.

W celu zobrazowania wyizolowanych populacji ektosomów i egzosomów wykorzystano transmisyjną mikroskopię elektronową (z ang. TEM). Przykładowe zdjęcia mikropęcherzyków przedstawiono poniżej.



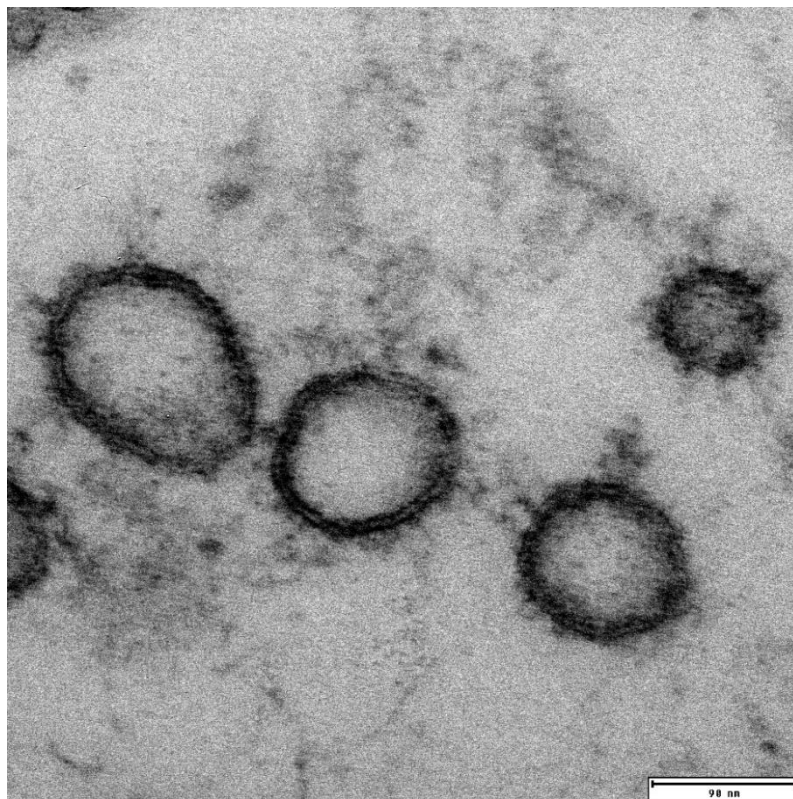
Rysunek 17 Przykładowe zdjęcia ektosomów (A,C) i egzosomów (B,D) wyizolowanych z linii komórkowej TIME (A,B) oraz HUVEC (C,D).



Rysunek 18 Rozkład wielkości ektosomów (A,C) i egzosomów (B,D) wyizolowanych z linii komórkowej TIME (A,B) oraz HUVEC (C,D) z dopasowaniem LogNormal zaznaczonym na czerwono.

Analiza zdjęć pęcherzyków wyizolowanych z linii komórkowej TIME oraz HUVEC wykazała rozmiar zarówno ektosomów jak i egzosomów w granicy 10 - 400 nm. Uzyskane zdjęcia wykazały heterogeniczność uzyskanych populacji pęcherzyków. Zaobserwowano charakterystyczną dla mikropęcherzyków podwójną błonę (Rys.19). Dopasowanie wielopikowej funkcji Log-normal wskazało obecność dwóch głównych populacji ektosomów wyizolowanych z linii komórkowej TIME, wynoszących 69,35 i 181,14 nm. Dla tej samej linii komórkowej wykazano obecność czterech głównych populacji egzosomów wynoszących 71.06, 122.85, 199.66 oraz 345.22 nm. Natomiast w przypadku linii komórkowej HUVEC

wykazano pojedyncze, główne populacje egzosomów (108,28 nm) oraz ektosomów (108,74nm).



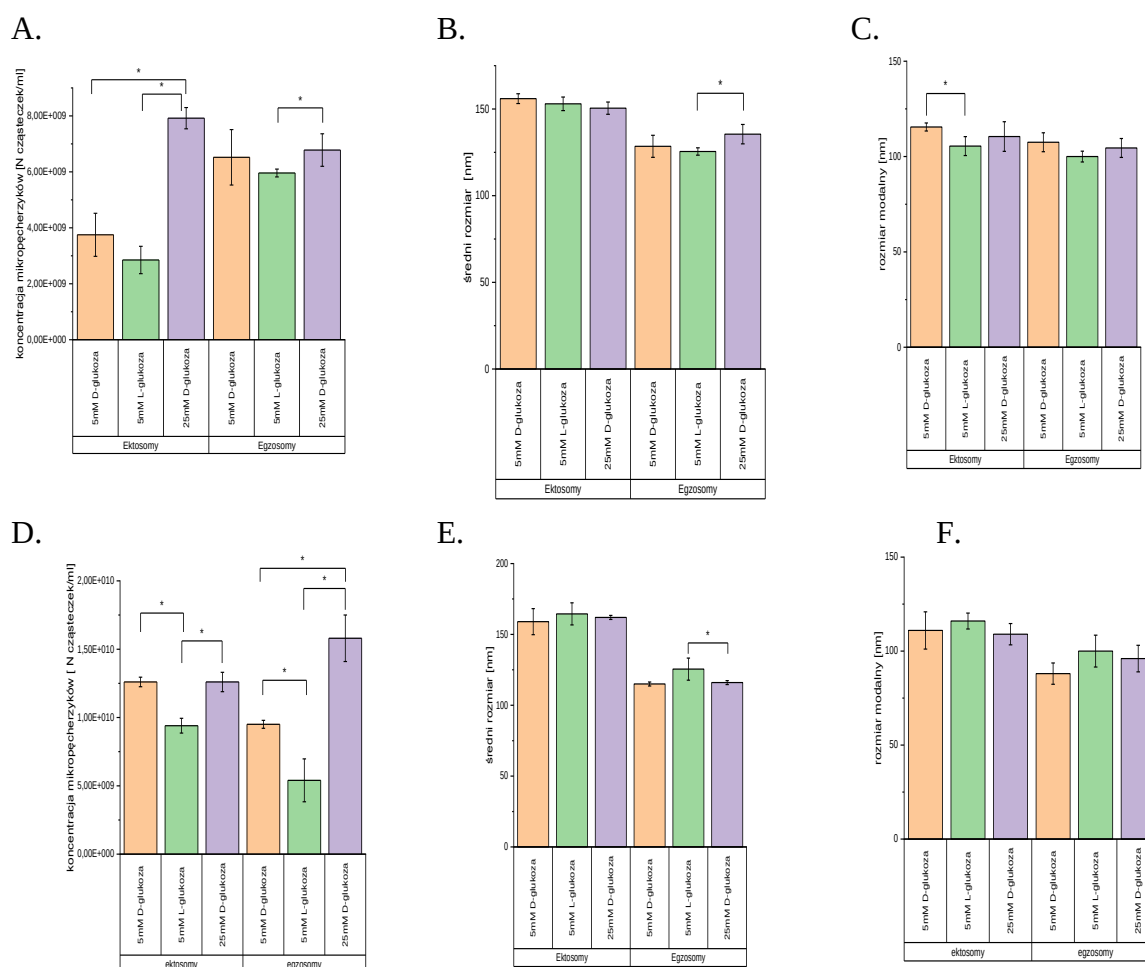
Rysunek 19 Podwójna błona komórkowa mikropęcherzyków widoczna w mikroskopii TEM na przykładzie próbki egzosomów TIME.

13. Ocena właściwości biologicznych mikropęcherzyków

13.1. Pomiar wielkości mikropęcherzyków izolowanych z hodowli normo- i hiperglikemicznych w oparciu o metodę qNano.

Badania przeprowadzone na linii komórkowej HUVEC wykazały, że hiperglikemia (25 mM D-glukoza) powoduje zwiększoną sekrecję ektosomów i egzosomów w porównaniu do warunków kontrolnych (normoglikemia = 5 mM D-glukoza) oraz zwiększa średnią wielkość egzosomów. Kontrola osmomolarna (5 mM L-glukoza) zmniejsza wartość modalną ektosomów (Ryc.20).

Badania przeprowadzone na linii komórkowej TIME wykazały wzrost sekrecji egzosomów w warunkach hiperglikemicznych oraz spadek sekrecji zarówno egzosomów jak i ektosomów w warunkach kontroli osmomolarnej (Ryc.20).



Rysunek 20 Wykresy koncentracji (A,D), średniej wielkości (B,E) oraz wartości modalnej (C,F) mikropęcherzyków izolowanych odpowiednio z HUVEC (A,B,C) oraz TIME (D,E,F) izolowanych z warunków normoglikemicznych, hiperglikemicznych oraz kontroli osmomolarnej.

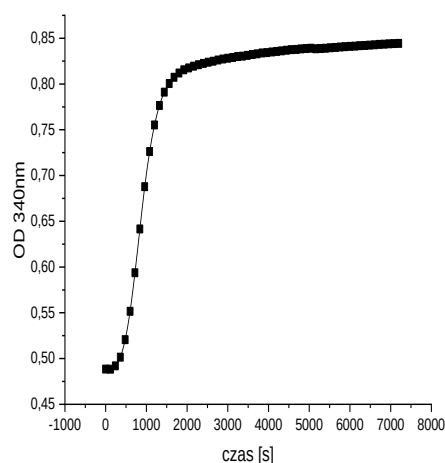
13.2. Pomiar właściwości fibrynolitycznych mikropęcherzyków.

W celu zbadania aktywności fibrynolitycznej wyizolowanych mikropęcherzyków, zmierzono ich zdolność do trawienia skrzepu powstałego poprzez inkubację osocza ubogopłytkowego z trombiną (Ryc. 21.). Pozytywną kontrolę stanowiło dodanie urokinazy (uPA) w zamian za EV.

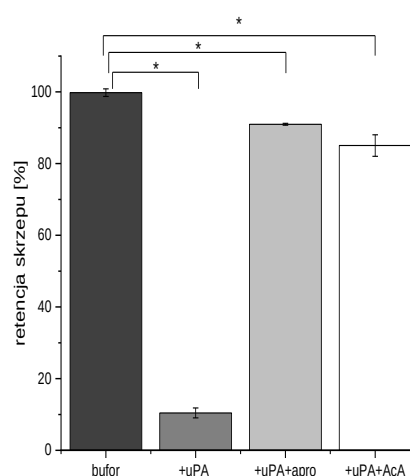
Zdecydowana większość receptorów plazminogenu wykorzystuje karboksy- końcową resztę lizyny do wiązania domen wiążących lizynę plazminogenu i tPA. Z tego względu wykorzystaliśmy dwa związki antyfibrynolityczne, w celu charakteryzacji aktywności fibrynolitycznej EV: kwas ϵ - aminokapronowy (AcA), który blokuje aktywację plazminogenu poprzez zablokowanie oddziaływań karboksy-koncowej reszty lizyny fibryny i receptorów plazminogenu z domeną kringle plazminogenu, która wiąże lizynę oraz aprotyninę (apro), która jest potencjalnym inhibitorem miejsc aktywnych plazminogenu.

Obie populacje EV wyizolowane z wykorzystanych linii komórkowych wykazują aktywność fibrynolityczną, która zostaje zahamowana po dodaniu apro oraz AcA (Ryc.21). Wyższą aktywność fibrynolityczną wykazują populacja ektosomów.

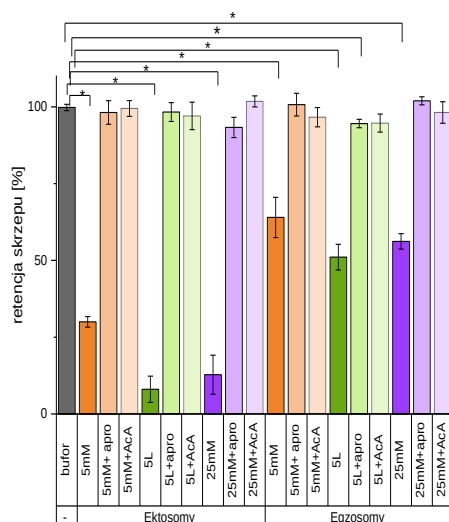
A.



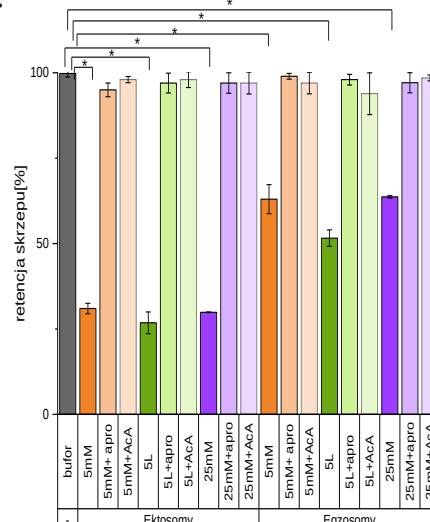
B.



C.



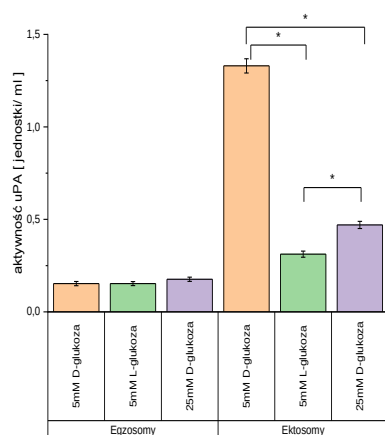
D.



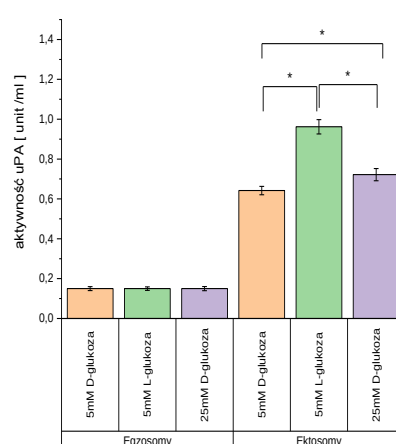
Rysunek 21 A. Turbidymetryczny test tworzenia skrzepu. B. Aktywność fibrynolityczna urokinazy. C.D. Aktywność fibrynolityczna egzosomów i ektosomów wyizolowanych z komórek śródbłonna (HUVEC i TIME odpowiednio).

13.3. Aktywność urokinazy w mikropęcherzykach.

A.



B.



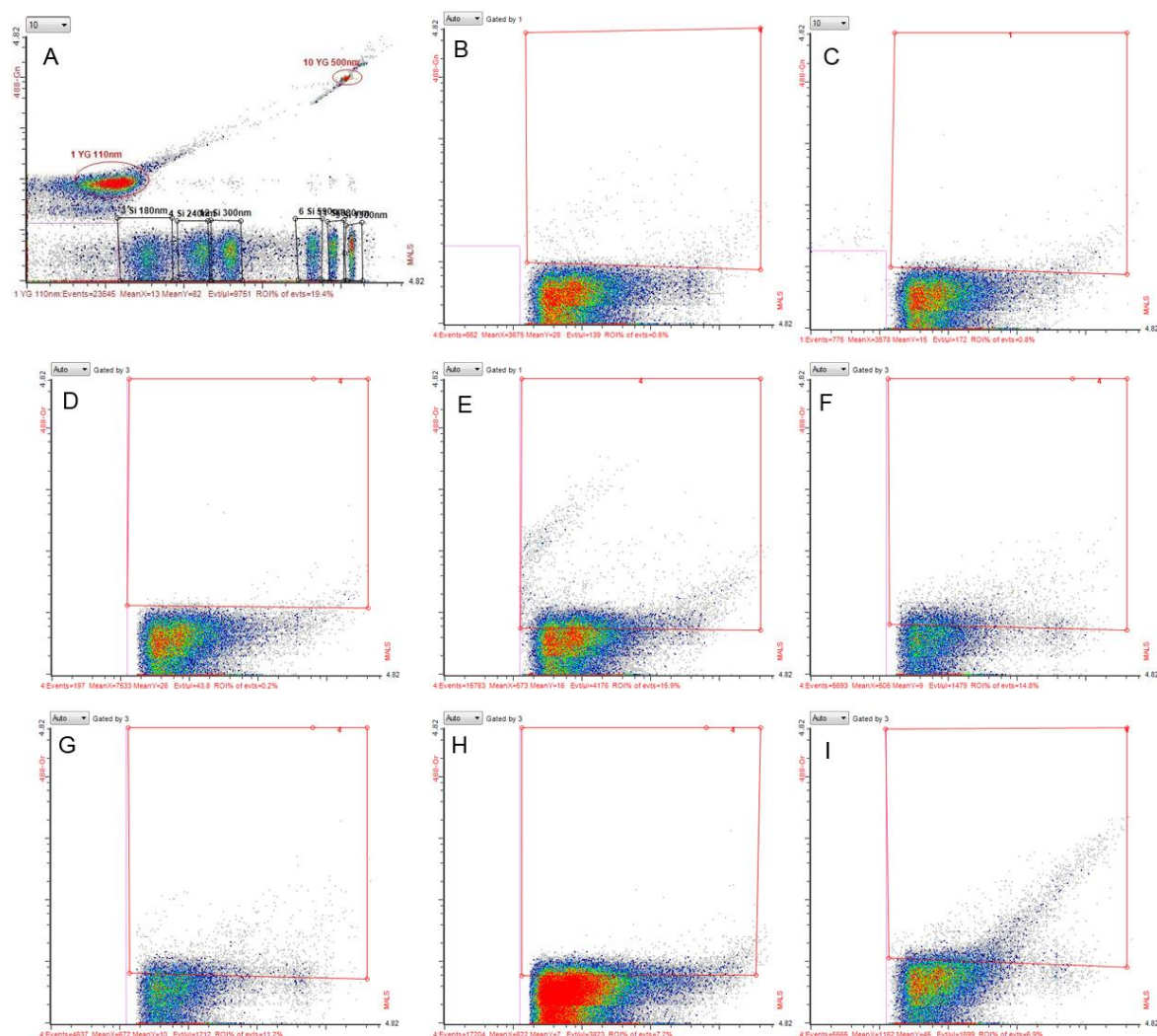
Rysunek 22 Aktywność uPA w EV wyizolowanych z TIME (A) oraz HUVEC (B).

Aktywność urokinazy wykazano w obu populacjach EV izolowanych z TIME i HUVEC, zaznaczając wyższy poziom w próbkach ektosomów.

W przypadku EV izolowanych z linii komórkowej TIME zaobserwowano spadek aktywności uPA dla ektosomów izolowanych z warunków hiperglikemicznych oraz kontroli

osmomolarnej. Ektosomy izolowane z komórek HUVEC hodowanych w warunkach kontroli osmomolarnej wykazują wzrost aktywności uPA.

13.4. Analiza markerów powierzchniowych przy użyciu cytometrii przepływowej Apogee



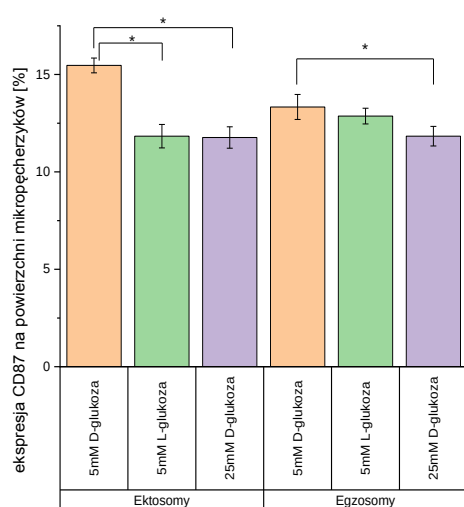
Rysunek 23 Przykładowe wykresy z cytometrii przepływowej do analizy markerów powierzchniowych. A Kalibrator, B. Ektosomy bez barwienia, C. Kontrola izotypowa IgG1, D. kontrola izotypowa IgG2, E. CD87, F. CD63, G. CD151, H. aneksyna V, I. Wnt3a.

Analiza cytometryczna wykazała obecność uPAR na powierzchni obu populacji mikropęcherzyków. Ponadto ligand szlaku sygnalizacyjnego Wnt zależnego od beta-kateniny, Wnt3a jest również obecny na powierzchni obu frakcji pęcherzyków.

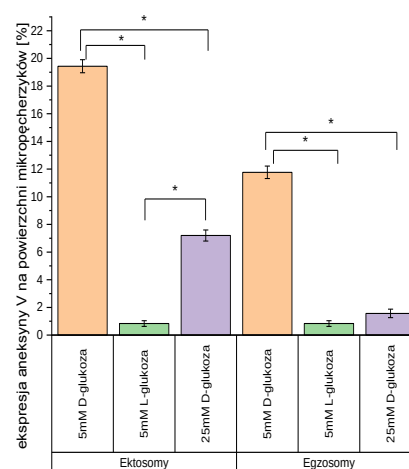
Analiza markerów tj. CD63, CD151 oraz aneksyny V potwierdziły obserwacje uzyskane z pomiarów przy użyciu mikroskopu transmisyjnego, wskazując krzyżowe zanieczyszczenie populacji.

Dodatkowo zaobserwowano zróżnicowane działanie hiperglikemii na ekspresję markerów powierzchniowych. Badania przeprowadzone na linii komórkowej TIME wykazały spadek liczby uPAR-pozytywnych pęcherzyków wyizolowanych z warunków hiperglikemicznych, natomiast wzrost liczby Wnt3a-pozytywnych ektosomów i spadek Wnt-3a - pozytywnych egzosomów.

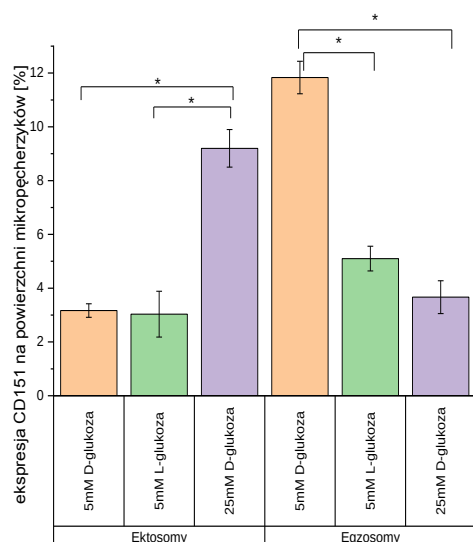
A.



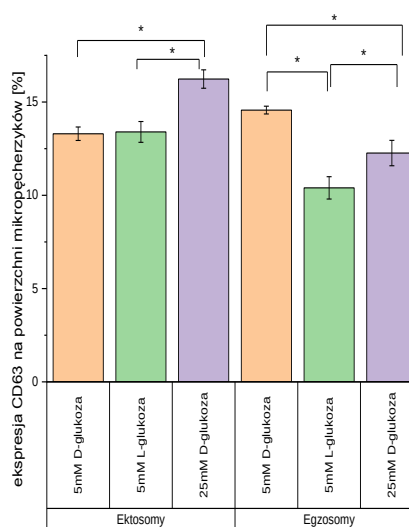
B.



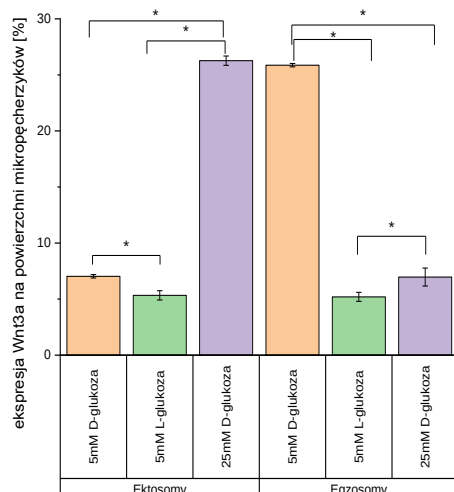
C.



D.



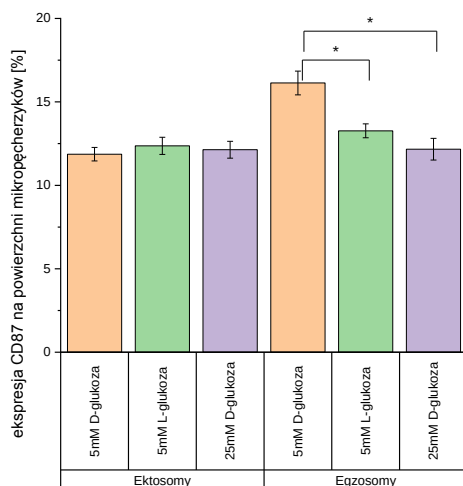
E.



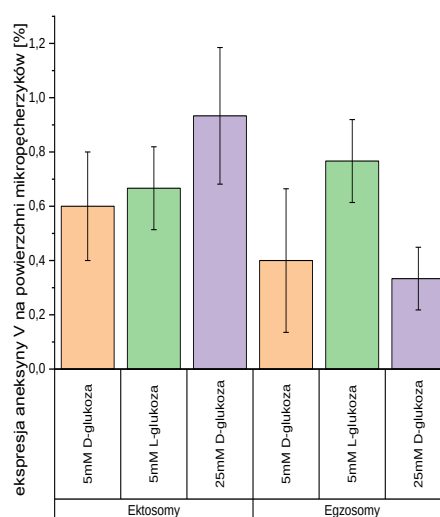
Rysunek 24 Analiza % ekspresji uPAR (A), aneksyny V (B), CD151 (C), CD63 (D) oraz Wnt3a (E) na powierzchni mikropęcherzyków izolowanych z linii komórkowej TIME.

Badania przeprowadzone na EV izolowanych z linii komórkowej HUVEC wykazały spadek liczby uPAR-pozytywnych ektosomów oraz wzrost liczby Wnt-3a-pozytywnych ektosomów i spadek Wnt-3a pozytywnych egzosomów w warunkach hiperglikemicznych.

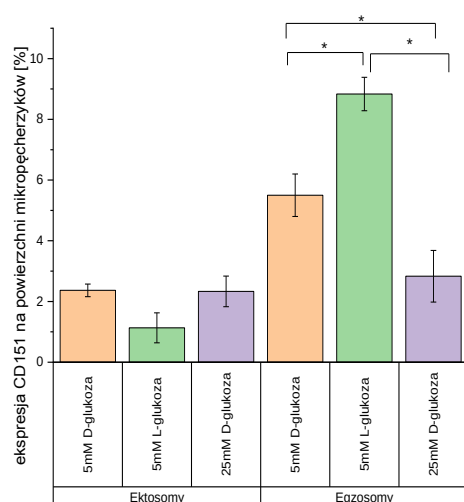
A.



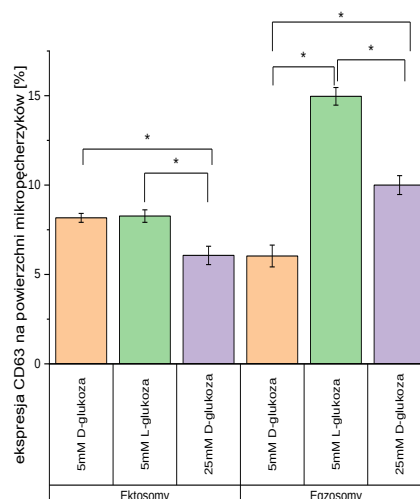
B.



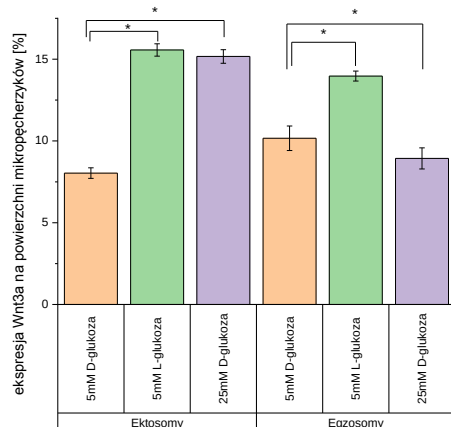
C.



D.



E.

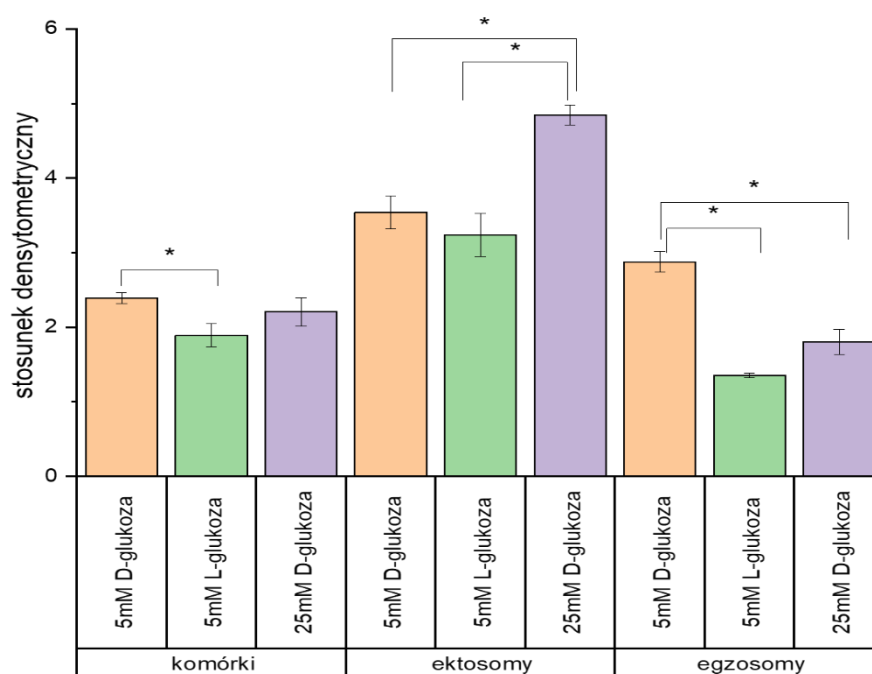
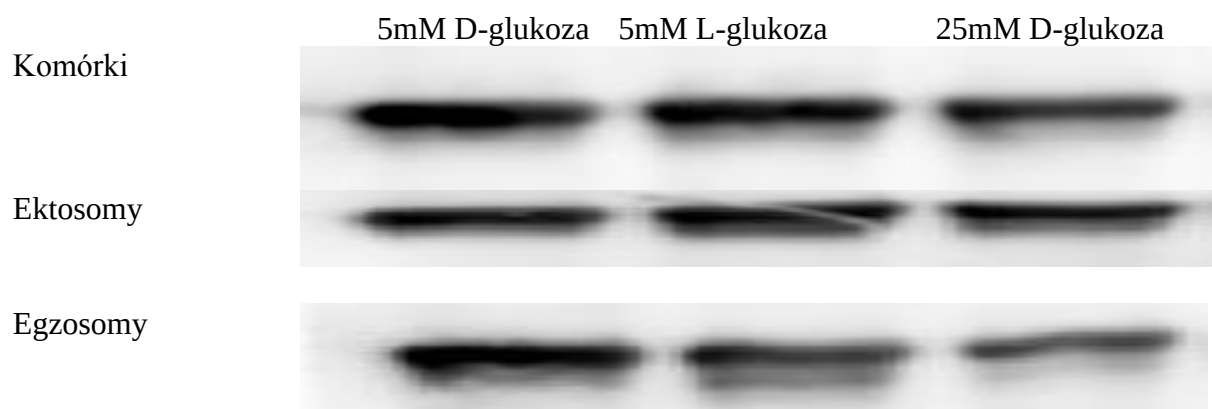


Rysunek 25 Analiza % ekspresji uPAR (A), aneksyny V (B), CD151 (C), CD63 (D) oraz Wnt3a (E) na powierzchni mikropęcherzyków izolowanych z linii komórkowej HUVEC.

14. Ekspresja uPAR i beta-kateniny w komórkach oraz wyizolowanych mikropęcherzykach.

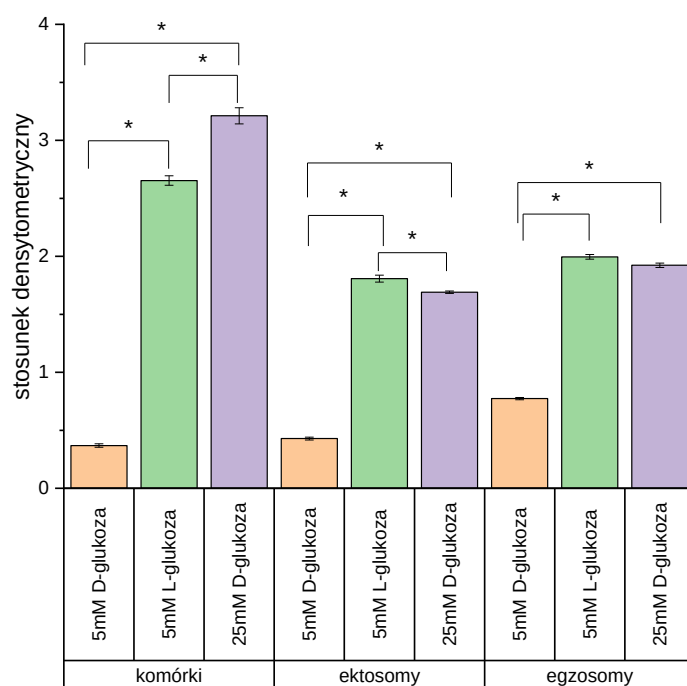
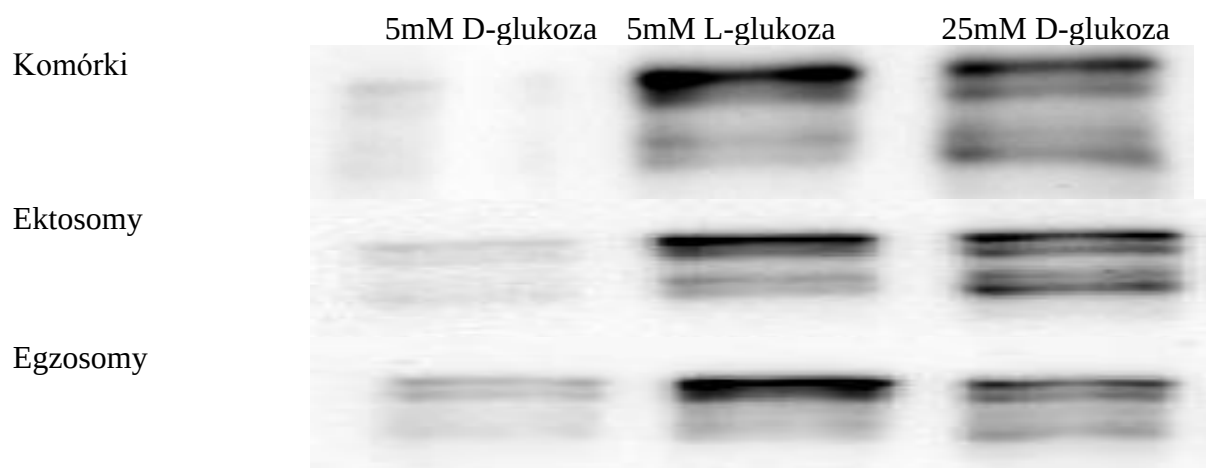
Analiza ekspresji białka w lizatach komórkowych oraz z EV wykazała obecność uPAR oraz beta-kateniny we wszystkich wymienionych frakcjach.

Hiperglikemia zwiększa ekspresję uPAR w ektosomach oraz obniża ekspresję tego receptora w egzosomach pochodzących z linii komórkowej TIME (Ryc. 26.). Odwrotną zależność zaobserwowano dla pęcherzyków wyizolowanych z linii komórkowej HUVEC (Ryc.27.).

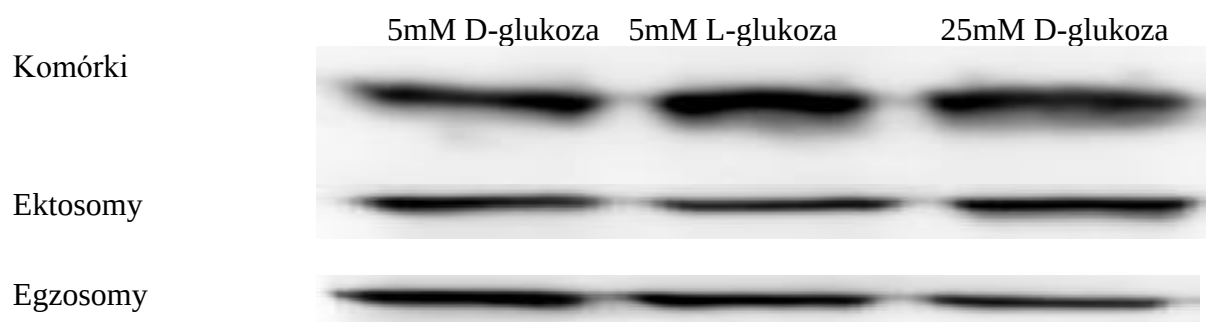


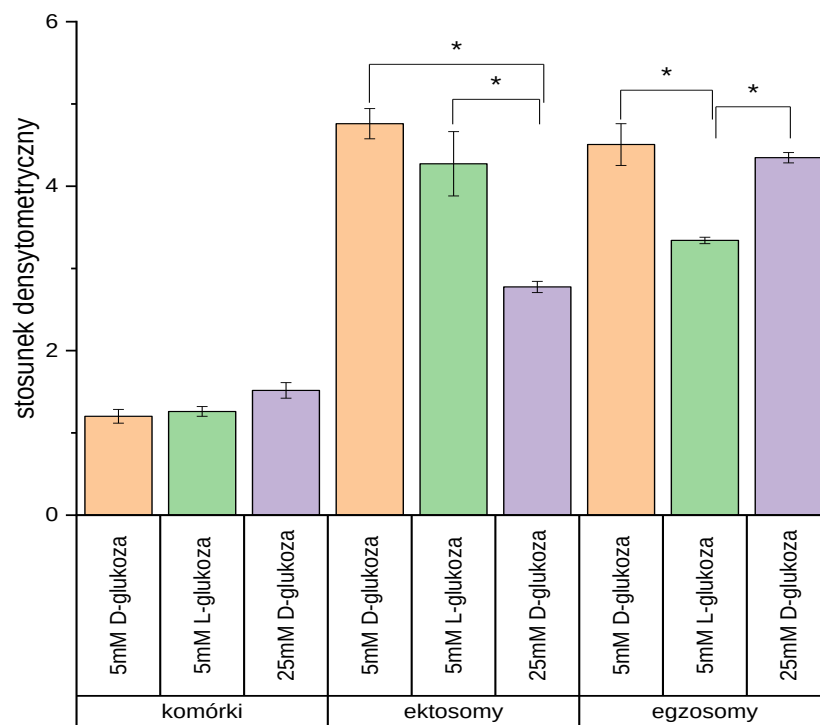
Rysunek 26 Ekspresja uPAR w komórkach i pęcherzykach linii komórkowej TIME.

Zwiększoną ekspresję beta-kateniny w obu populacjach pęcherzyków wyizolowanych w warunkach hiperglikemicznych zaobserwowano w przypadku linii komórkowej TIME, podczas obniżenie ekspresji tego białka wykazano w hiperglikemicznych pęcherzykach izolowanych z HUVEC.

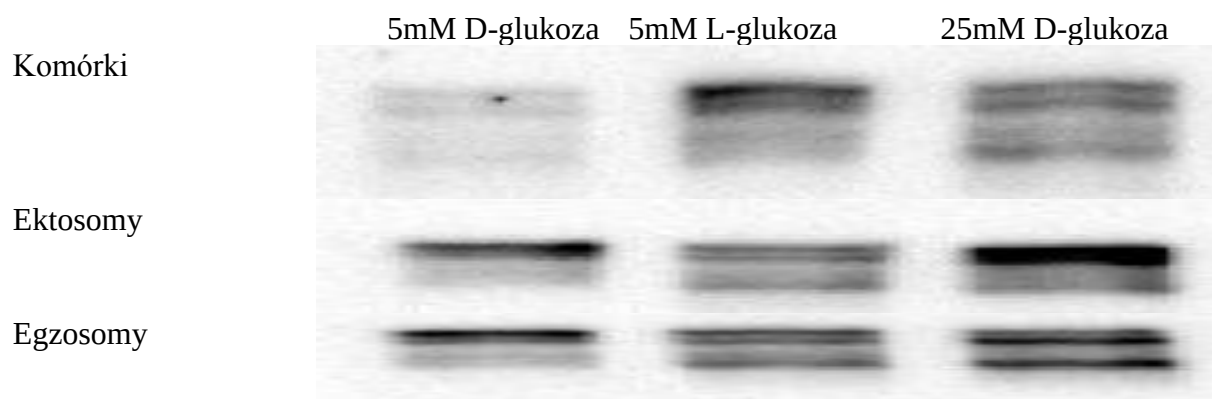


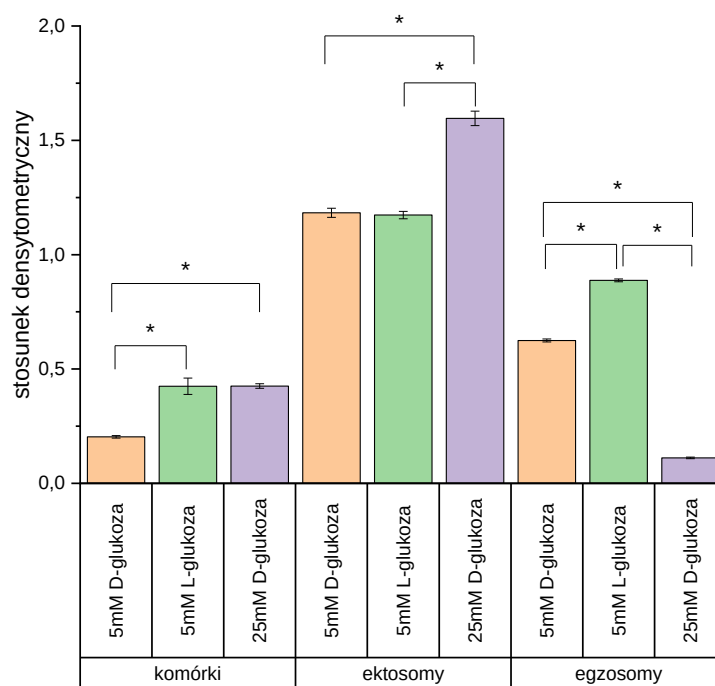
Rysunek 27 Ekspresja beta-kateniny w komórkach i pęcherzykach linii komórkowej TIME.





Rysunek 28 Ekspresja uPAR w komórkach i pęcherzykach linii komórkowej HUVEC.

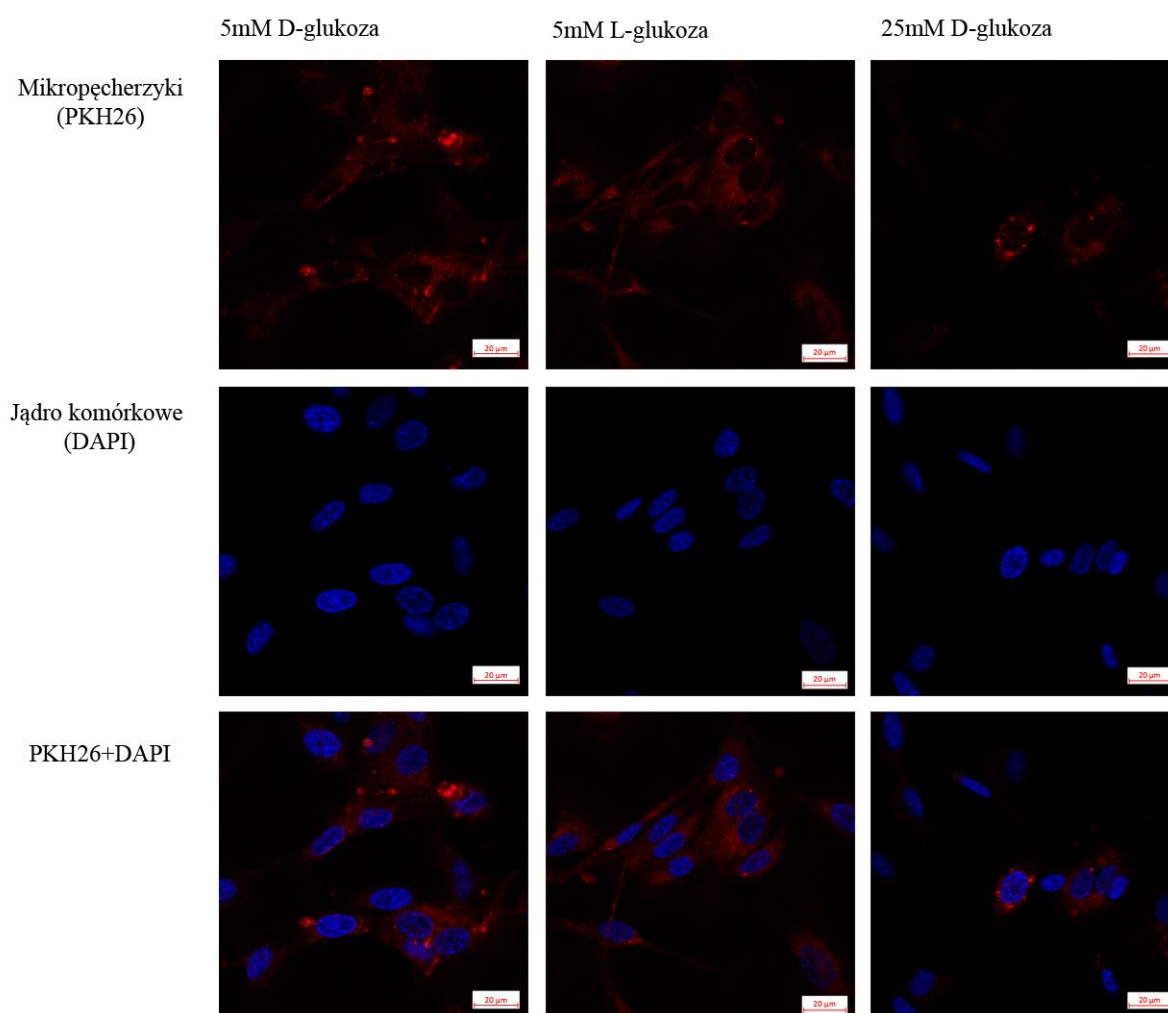




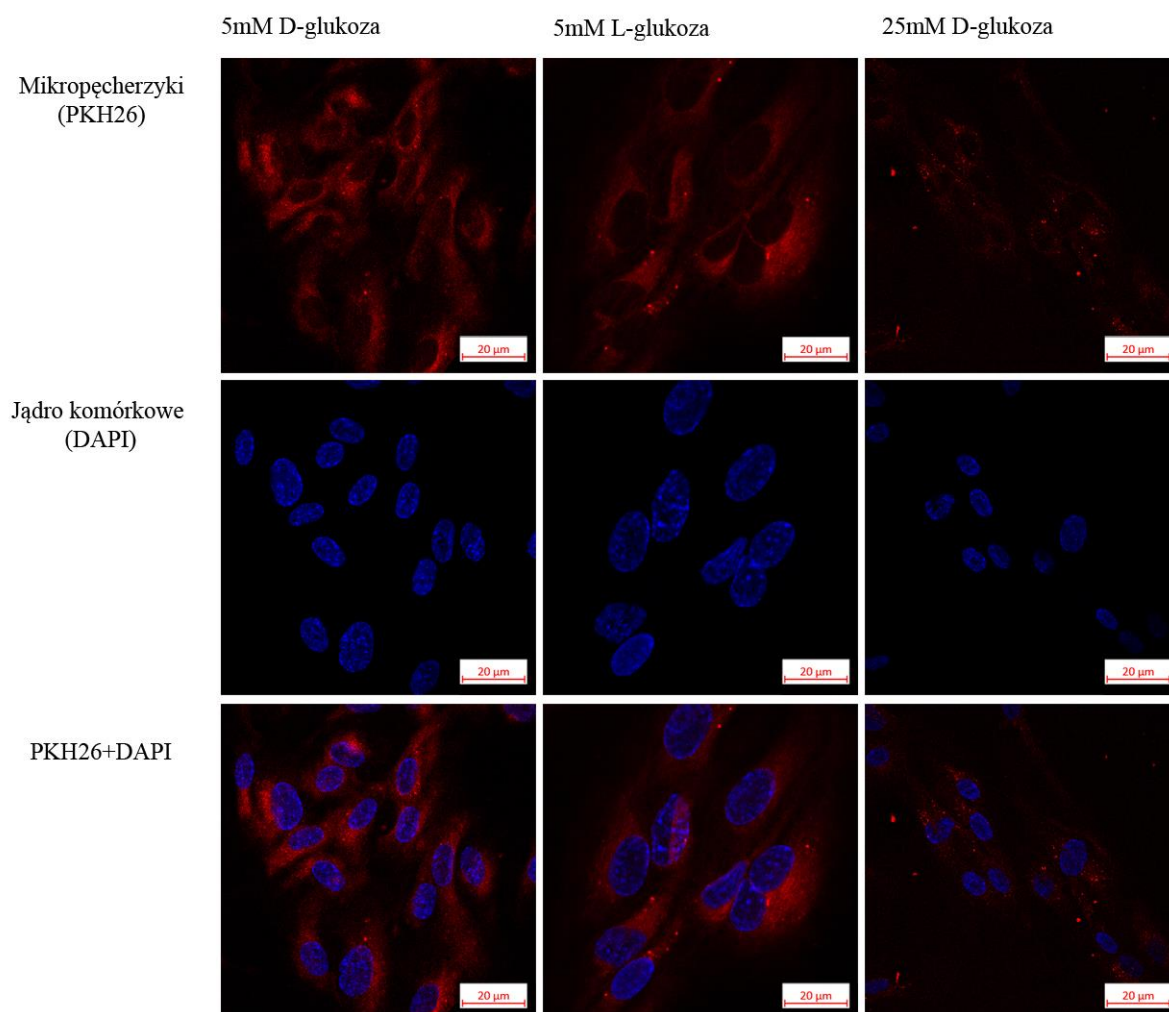
Rysunek 29 Ekspresja beta-kateniny w komórkach i pęcherzykach linii komórkowej HUVEC.

15. Wizualizacja internalizacji EV.

Przeprowadzone barwienie internalizacji EV wybarwionych PKH26 potwierdza internalizację mikropęcherzyków śródbłonkowych. EV izolowane z warunków hiperglikemicznych wykazują zmniejszoną internalizację do komórek hodowanych w normoglikemii, w odniesieniu do EV izolowanych z normoglikemii oraz kontroli osmomolarnej. EV zlokalizowane są w całej cytoplazmie, z największym zagęszczeniem w okolicy około jądrowej.



Rysunek 30 Internalizacja EV izolowanych z komórek TIME.



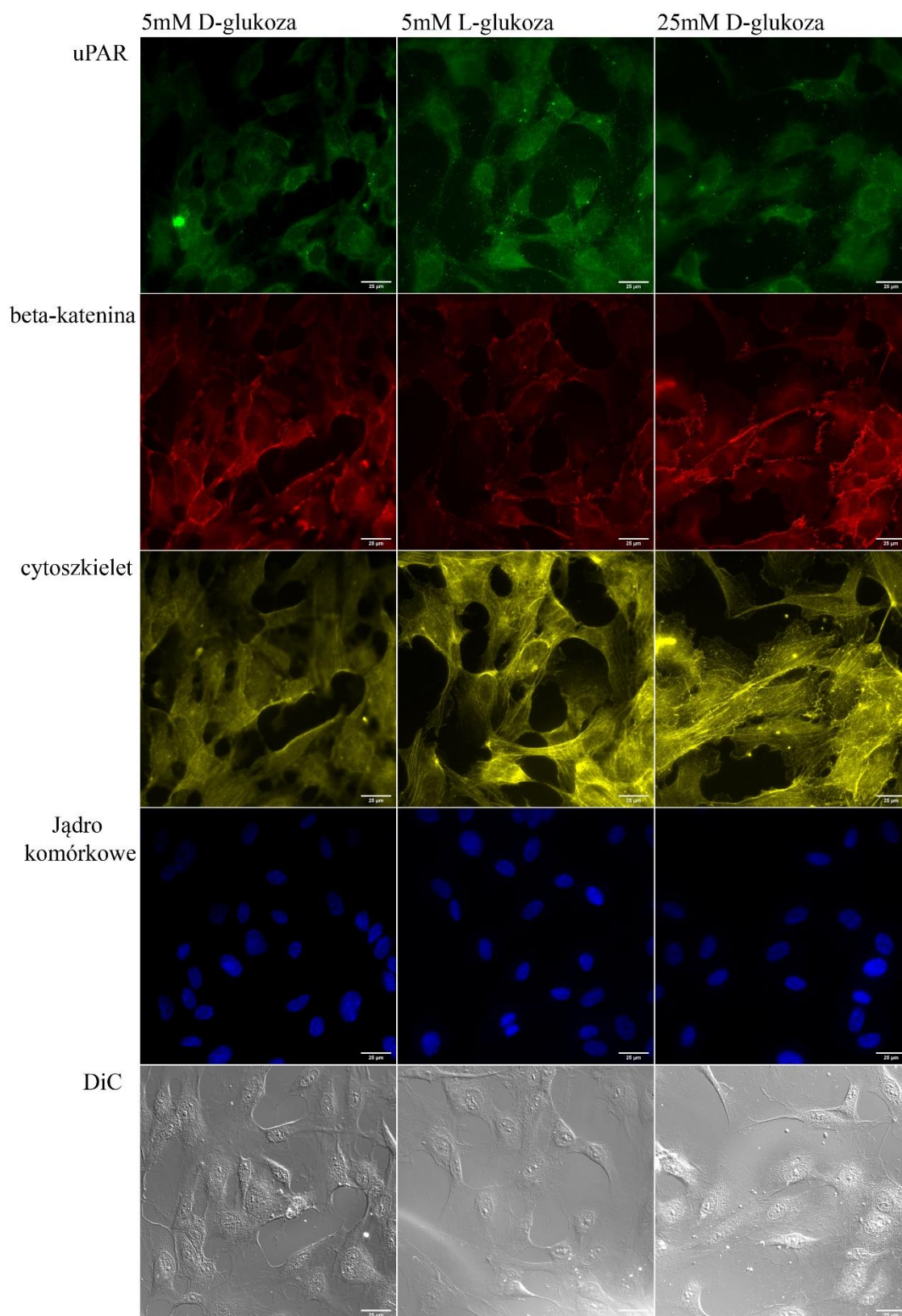
Rysunek 31 Internalizacja EV izolowanych z komórek HUVEC.

16. Ocena kolokalizacji uPAR i beta-kateniny.

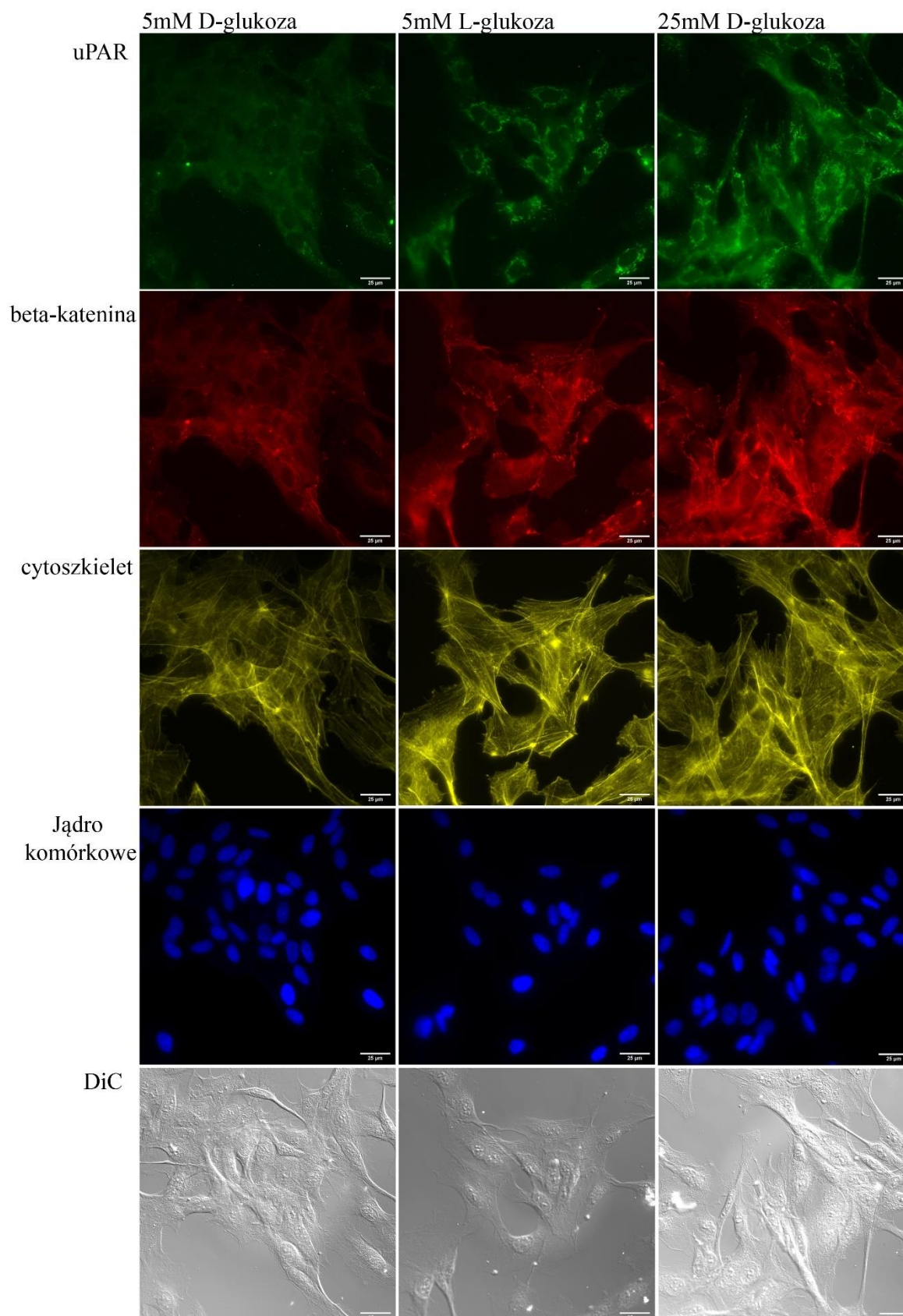
Barwienie komórek linii TIME wykazało rozmieszczenie uPAR na całej powierzchni komórki, z najmniejszą koncentracją w okolicach jądra komórkowego, beta-katenina zlokalizowana jest w okolicach złącz komórkowych.

Natomiast w przypadku linii komórkowej HUVEC wykazano obecność uPAR w obrębie błony komórkowej z największym zagęszczeniem w okolicach jądra, beta-katenina obecna jest w złączach szczelinowych oraz w cytoplazmie.

W przypadku obu linii komórkowych nie zaobserwowano kolokalizacji między beta-kateniną i uPAR.



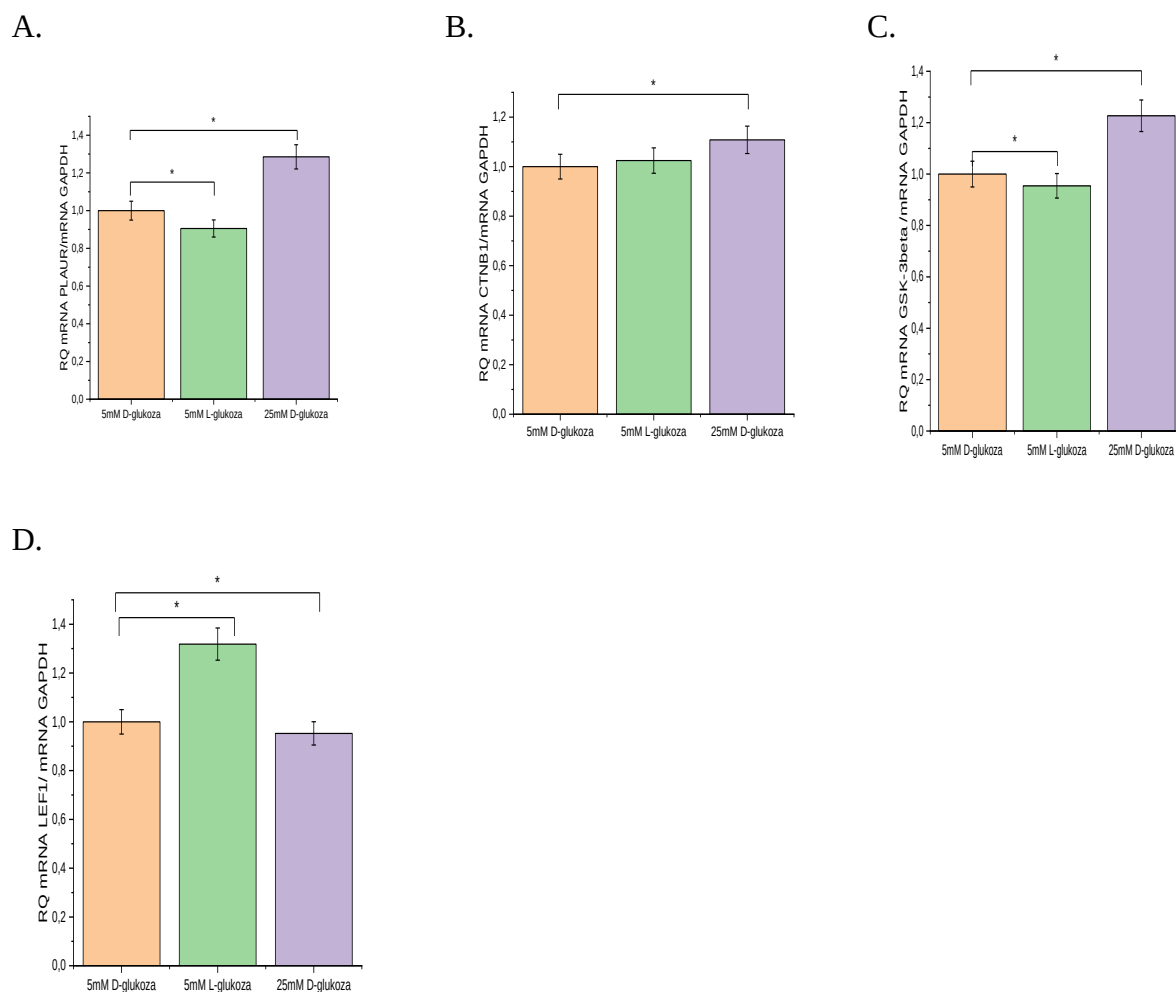
Rysunek 32 Barwienie fluorescencyjne uPAR oraz beta-kateniny na komórkach HUVEC hodowanych w warunkach normo- oraz hiperglikemii oraz kontroli osmomolarnej.



Rysunek 33 Barwienie fluorescencyjne uPAR oraz beta-kateniny na komórkach TIME hodowanych w warunkach normo- oraz hiperglikemii oraz kontroli osmomolarnej.

17. Analiza ekspresji genów związanych ze szlakiem sygnalizacyjnym Wnt

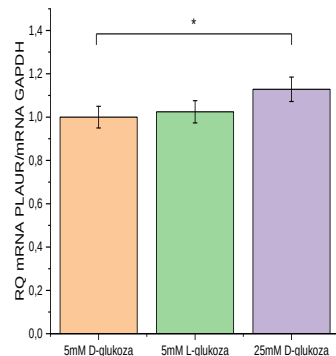
Hiperglikemia zwiększa ekspresję genu PLAUR, CTNB1 oraz GSK-3 β , oraz obniża ekspresję genu LEF1 w komórkach linii TIME.



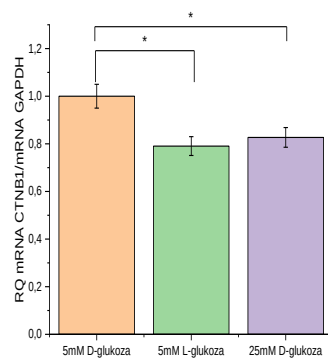
Rysunek 34 Ekspresja genów w warunkach normoglikemii, hiperglikemii oraz kontroli osmomolarnej dla linii komórkowej TIME. A. PLAUR, B. CTNB1, C. GSK-3 β , D. LEF1,

Pomiar ekspresji genów w komórkach HUVEC hodowanych w warunkach hiperglikemicznych wykazał, wzrost ekspresji genu PLAUR oraz GSK-3 β , natomiast spadek ekspresji CTNB1 oraz LEF-1.

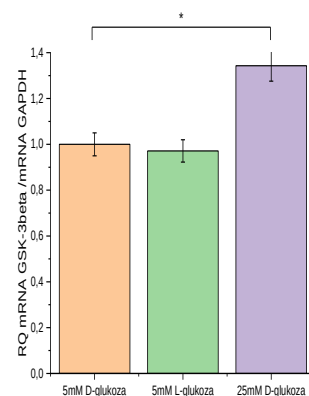
A.



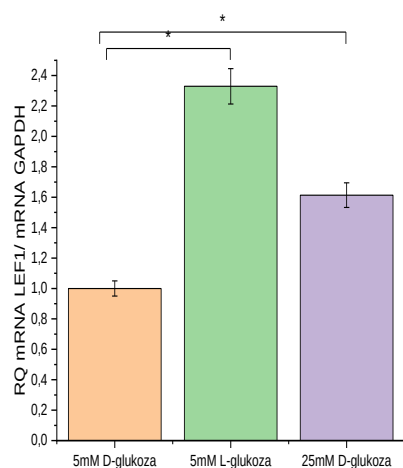
B.



C.



D.



Rysunek 35 Ekspresja genów w warunkach normoglikemii, hiperglikemii oraz kontroli osmomolarnej dla linii komórkowej HUVEC. A. PLAUR, B. CTNNB1, C. GSK-3 β , D. LEF1,

18. DYSKUSJA

W swojej pracy doktorskiej skupiłam się na dwóch głównych założeniach pracy: określeniu parametrów izolacji subpopulacji mikropęcherzyków oraz analizie właściwości fibrynolitycznych pęcherzyków pochodzenia śródbłonkowego.

18.1. Izolacja mikropęcherzyków.

Dotychczas opracowano wiele metod izolacji mikropęcherzyków tj. ultrawierowanie, wierowanie różnicowe, precypitacja, filtracja, chromatografia, techniki mikroprzepływowe oraz wychwyt pęcherzyków z wykorzystaniem swoistych przeciwciał przeciwko markerom powierzchniowym.

W swojej pracy doktorskiej zastosowałam parametry wierowania od 3.000 do 18.000 xg dla ektosomów, które wykazały zbliżone rozkłady uzyskanych pęcherzyków w odniesieniu do danych teoretycznych wyliczonych w oparciu o model Mikhail A. Livshits. Największą rozbieżność uzyskano dla wierowania 10.000xg. Natomiast największe rozbieżności dla populacji egzosomów uzyskałam dla nadsączy otrzymanych po wierowaniu przy 18.000 x g. Wykonana przeze mnie charakterystyka EV (ocena rozkładów wielkości EV) wykazała krzyżowe zanieczyszczenie dwóch subpopulacji pęcherzyków. Potwierdzenie niniejszych obserwacji uzyskałam poprzez analizę zdjęć z mikroskopu transmisyjnego oraz analizę ekspresji białek markerów powierzchniowych.

Najczęściej stosowaną techniką izolacji egzosomów jest ultrawierowanie przy przyspieszeniach rzędu 100.000 - 200.000xg [^{123,124}], natomiast dla ektosomów wierowanie przy 10.000 - 20.000 x g [¹²⁵]. Wyniki uzyskane przeze mnie z pomiarów qNano, analiz cytometrii przepływowej, western blot oraz TEM wskazują na krzyżowe zanieczyszczenie próbek, a więc również sedymentację egzosomów przy niższych prędkościach. Również badania przeprowadzone przez Dennis K. Jeppesen i wsp. [¹²⁶] wykazały sedymentację egzosomów przy niższych parametrach wierowania tj. 33 000 x g.

Podczas pracy z próbkami pęcherzyków zewnątrzkomórkowych największym ograniczeniem jest czułość. Najczęściej stosowanymi metodami do analizy wielkości mikropęcherzyków jest NTA (z ang. *Nanoparticle Tracking Analysis*) oraz DLS (z ang. *Dynamic Light Scattering*), które opierają się na analizie ruchów Browna poruszających się molekuł [^{127, 128}]. Limit wielkości cząsteczek wykrywanych przy pomiarach wykonywanych

z zastosowaniem wspomnianych powyżej metod wynosi 1-1.000 nm i 30-1.000 nm, dla DLS oraz NTA odpowiednio. Należy mieć na uwadze, że dolna granica wykrywalności zależy od współczynnika załamania światła badanych nanocząstek [129]. W prezentowanej pracy przeprowadziłam pomiary przy użyciu qNano (TRPS), jest coraz częściej wykorzystywana metoda do analizy wielkości, stężenia oraz ζ -potencjału EV a także naocząstek, liposomów itp. [130]. Na korzyść niniejszej metody przemawia niewielka objętość analizowanej próbki oraz możliwość dokładniejszego rozdzielania cząsteczek różnej wielkości. Jednakże praktycznym ograniczeniem pomiaru próbek biologicznych za pomocą TRPS jest zatykanie porów. Do zatkania porów mogą się przyczynić gromadzące białka o wysokiej masie cząsteczkowej, (takich jak czynnik von Willebranda, fibrynogen) lub obecność cząstek o średnicy większej niż pory (m.in. ciała apoptotyczne, fragmenty komórek, agregaty pęcherzyków) [131].

W celu zbadania stabilności wyizolowanych subpopulacji mEV zmierzono ζ -potencjał. Uzyskane wartości $-9,3 \pm 0,7$ mV dla ektosomów, a dla egzosomów $-11,35 \pm 1,9$ mV wykazują tendencję do agregacji EV. Wartość -10 mV jest powszechnie uznawana za minimalna wartość progowa dla stabilności próbki w dyspersji [132]. Ujemna wartość zmierzonego parametru wynika z obecności fosfatydyloseryny na zewnętrznej powierzchni mikropęcherzyków [133,134]. Uzyskane wyniki są zbliżone do danych uzyskanych przez Duc Bach Nguyena i wsp., którzy wykazali potencjał ζ EV wyizolowanych z czerwonych krwinek w granicy -10 mV [135].

W przeciwieństwie do wirowania izopyncznego i strefowego, wirowanie różnicowe rozpoczyna umieszczenia zawiesiny jednorodnie rozmieszczonych cząstek w próbówce do wirowania. Już podczas pierwszego wirowania, nawet po zastosowaniu niewielkich prędkości kątowych (siły odśrodkowej rzędu $2.000 \times g$) pewien odsetek małych cząstek znajdujących się w pobliżu dna próbówki nieuchronnie opada razem z większymi cząstkami. Ta jednoczesna sedymentacja prowadzi do zmniejszenia końcowej wydajności izolacji mniejszych cząstek. Jednakże niektóre duże cząstki, początkowo zlokalizowane w pobliżu menisku próbówki wirowniczej, mogą nie opaść na dno próbówki w określonym czasie, przez co stanowią zanieczyszczenie osadu mniejszych cząsteczek przy kolejnym wirowaniu [111].

Stopień zanieczyszczenia jest zależny od względnej prędkości sedymentacji (v) różnych populacji cząstek oraz warunków wirowania. Protokół wirowania różnicowego można skutecznie zoptymalizować poprzez dobór odpowiednich prędkości wirowania oraz

czasu wirowania, aby uzyskać zarówno wysoką wydajność, jak i czystość wyizolowanych populacji. Proces optymalizacji jest mniej skuteczny, gdy występują niewielkie różnice we współczynnikach sedimentacji między różnymi frakcjami cząstek ($S_{egzo} \approx S_{ekto}$).

W oparciu o dane umieszczone w tabeli 1 (tzn. zakres wielkości obu populacji mikropęcherzyków) oraz wzór 2, wyliczono współczynnik sedimentacji dla obu frakcji EV. Wartość S_{egzo} mieści się w zakresie od 72,8 do 1.160 S, natomiast wartość S_{ekto} od 809 do 81.000 S. Nałożenie się zakresu wartości współczynnika sedimentacji dla obu populacji EV powoduje zanieczyszczenie krzyżowe próbek, co wykazałam w mojej pracy doktorskiej.

W takich przypadkach, w zależności od warunków wirowania, albo wydajność małych cząstek będzie niska (przy wyższych RPM i / lub dłuższym wirowaniu zapewniającym całkowitą sedimentację większych cząstek podczas pierwszych etapów wirowania) lub końcowy osad małych cząstek zostanie zanieczyszczony krzyżowo większymi cząstkami (w łagodnych warunkach w pierwszym wirowaniu, tzn. niższe RPM i / lub krótsze czasy wirowania) [111].

Protokół wirowania należy dostosować tak, aby uwzględniał zarówno właściwości rotorów (R, k), jak i charakterystykę cząstek, które mają być rozdzielone (gęstość i promień). Oddzielenie egzosomów od dużych obiektów (tj. komórki, fragmenty komórek, ciałek apoptotycznych) jest stosunkowo proste ze względu na dużą różnicę wielkości. Natomiast rozdzielenie egzosomów (30 - 120 nm) i ektosomów (100-1000nm) jest trudniejsze ze względu na bliskie podobieństwo ich wielkości. Dlatego rozdzielenie populacji EV przez wirowanie różnicowe jest trudne i nieefektywne [111].

Wartości gęstości mikropęcherzyków są zbliżone do gęstości białek, co sugeruje że w trakcie wirowania razem z pęcherzykami osadzają się białka tj. albumina lub fibrynogen. Przy użyciu napisanego programu do mojej pracy doktorskiej wyliczyłam wydajność sedimentacji zwiniętej oraz rozwiniętej formy wyżej wymienionych białek. Istnieje niewielkie prawdopodobieństwo osadzenia albuminy (66,5 kDa) w którejkolwiek frakcji mikropęcherzyków, również wydajność osadzania fibrynogenu jest niewielka, gdyż roztworach występuje on w formie zwiniętej [136].

W oparciu o uzyskane wyniki modelowania, do dalszych badań posłużyłam się metodą wirowania przy 18.000 x g do izolacji ektosomów oraz ultrawirowanie przy 150.000 x g do izolacji egzosomów. Analiza TEM wykazała zróżnicowaną morfologię EV. Zarówno

egzosomy, jak i ektosomy wyizolowane z linii komórkowej TIME charakteryzowały się bardziej regularnym, owalnym kształtem w porównaniu do pęcherzyków wyizolowanych z drugiej linii komórkowej. Zbliżony kształt pęcherzyków zaobserwowali również inni badacze pracując na linii komórkowej śródbłónka oraz ludzkiej linii leukemicznej [6,137].

Zanieczyszczenie EV potwierdziła również analiza ekspresji markerów powierzchniowych tj. CD63 i CD151(markery egzosomalne) oraz aneksyna V (marker ektosomalny). W swych badaniach, L. Durrieu i wsp. również wykazali ektosomalne zanieczyszczenie próbek egzosomów, wykazując ekspresję markera egzosomalnego ARF6 w próbkach EV izolowanych metodą ultrawirowania z kilku linii komórkowych nowotworu piersi [138]. Natomiast badania przeprowadzone przez G. K. Patel, i wsp. nie wykazały obecności markera ektosomalnego w próbce egzosomów uzyskanych metodą ultrawirowania. Różnica ta mogła wynikać z zastosowania innych parametrów wirowania oraz badań prowadzonych na innym typie komórek [139]. W tej samej pracy badacze zaobserwowali silną ekspresję białka ARF w próbce egzosomów izolowanej zestawem Invitrogen.

18.2. Charakterystyka mikropęcherzyków.

Przeprowadzona analiza metodą TRPS wykazała zróżnicowany wpływ hiperglikemii na sekrecję EV. Koncentracja egzosomów wzrosła w obu przypadkach, jednakże jedynie dla linii komórkowej HUVEC zaobserwowano wzrost stężenia wydzielanych ektosomów. Dodatkowo dla egzosomów izolowanych z HUVEC zaobserwowano wzrost średniej wielkości pęcherzyka.

Wzrost średniej wielkości egzosomów w warunkach hiperglikemicznych zaobserwowała M. Garcia-Contreras i wsp. jednakże wykazali niższe stężenie egzosomów względem kontroli [140]. Różnica mogła być związana z innym rodzajem materiału biologicznego, metodą izolacji i pomiaru wielkości. Grupa badawcza E. Stępień i wsp. również pracując na osoczu pacjentów z cukrzycą nie potwierdziła obserwacji M. Garcia-Contreras, nie zaobserwowano wpływu wysokiej dawki glukozy na koncentracje pęcherzyków oraz średnią wielkość [141]. Natomiast wzrost stężenia uwalnianych egzosomów zaobserwowano w komórkach trofoblastu hodowanych w warunkach wysokiej dawki glukozy [142].

Przeprowadzone pomiary cytometryczne oraz western blot wykazały obecność uPAR oraz beta-kateniny na powierzchni oraz wewnątrz WV. Obecność receptora dla uPA na pęcherzykach izolowanych z komórek śródbłónka wykazał już R. i wsp. [97].

Pomiary cytometryczne potwierdziły obecność ligandu Wnt3a na powierzchni ektosomów oraz egzosomów. W obu liniach komórkowych wykazano wzrost ilości Wnt3a-pozytywnych ektosomów i spadek ilości Wnt3a-pozytywnych egzosomów w warunkach hiperglikemicznych, co sugeruje, iż szlak sygnalizacyjny Wnt może być związany z procesem powstawania mikropęcherzyków. Obecność ligandów Wnt na powierzchni mikropęcherzyków wykazano również na pęcherzykach izolowanych ze spolaryzowanych komórek nabłonkowych [143], ssaczych komórkach progenitorowych [144] oraz ludzkich fibroblastach serca [145].

18.3. Ocena właściwości fibrynolitycznych mikropęcherzyków.

Przeprowadzony test skrzepu potwierdził fibrynolityczną aktywność EV. W przypadku pęcherzyków obu linii komórkowych wyższą aktywnością charakteryzowały się ektosomy w porównaniu do egzosomów. Hiperglikemia w zróżnicowany sposób modyfikowała aktywność pęcherzyków.

Ektosomy oraz egzosomy wyizolowane z hiperglikemicznej hodowli komórek HUVEC charakteryzują się wyższą aktywnością fibrynolityczną w porównaniu do EV normoglikemicznych. Nie zaobserwowano niniejszej zależności w odniesieniu do EV izolowanych z linii komórkowej TIME. Zależność widoczna w przypadku EV izolowanych z HUVEC jest trudna do wyjaśnienia przy obecnym stanie wiedzy, ponieważ przy cukrzycy dochodzi do wzrostu poziomu czynników prokoagulacyjnych w osoczu, któremu towarzyszy zmniejszona zdolność fibrynolityczna [146]. Jörneshog i wsp. jako pierwsi opublikowali zmodyfikowaną strukturę skrzepu w cukrzycy. Zaobserwowali, że skrzepy osocza od pacjentów z T1DM charakteryzują się zmniejszoną przepuszczalnością w porównaniu do kontroli, co wskazuje na bardziej zwartą strukturę, która jest niezależna od obecności powikłań mikronaczyniowych [147].

Aktywność fibrynolityczną względem czystego skrzepu fibrynologicznego dla obu populacji EV wykazali również Ludovic Durrieu i wsp. Zahamowanie aktywności fibrynolitycznej mikropęcherzyków przez Apro i e-ACA, które wykazaliśmy w naszych badaniach oraz we wspomnianej wyżej pracy sugeruje, że aktywność plazminy promowana przez mikropęcherzyki odbywa się poprzez karboksy-końcową lizynę receptora plazminogenu [138]. Jednakże fibrynolityczne działanie na skrzep osocza zaobserwowano jedynie dla egzosomów izolowanych z linii komórkowej MDA-MB-231. Mając na uwadze

zróżnicowaną strukturę skrzepu fibrynowego utworzonego z osocza oraz fakt, że jest on otoczony inhibitorami aktywatora plazminogenu (tj. PAI-1, α 2-antyplazmina), należy wziąć pod uwagę możliwość, iż nie wszystkie EV w warunkach fizjologicznych będą wykazywać aktywność fibrynolityczną. Co ważniejsze autorzy nie wykazali wzrostu niniejszej aktywności wraz ze wzrostem złośliwości komórek nowotworowych [138].

Przeprowadzony test kolorymetryczny wykazał aktywność urokinazy w próbkach EV. Ektosomy obu linii komórkowych charakteryzowały się wyższą aktywnością urokinazy. Hiperglikemia natomiast zwiększała aktywność w ektosomach izolowanych z HUVEC, podczas gdy zmniejszała aktywność w linii komórkowej TIME. Liliana Endo-Munoz również wykazał aktywność urokinazy w egzosomach wyizolowanych z metastatycznych komórek osteosarkomy. Aktywność tych egzosomów była 100 -1000 razy wyższa w porównaniu do uzyskanych przez nas wyników, co może być związane z inną metodyką izolacji egzosomów oraz rodzajem linii komórkowej [148].

18.4. Internalizacja mikropęcherzyków.

Komórki śródbłónka są komórkami naczyniowymi o właściwościach parakrynnych i autokrynnych. Poprzez sekrecję EV przyczyniają się do procesu krzepnięcia, jak i fibrynolizy. Odpowiadają również na różne sygnały pro- i przeciwzapalne [149]. Po internalizacji egzosomy pochodzące ze śródbłónka mają korzystny lub szkodliwy wpływ na docelowe komórki śródbłónka poprzez poprawę ich angiogennych właściwości lub utrzymanie patogennego fenotypu [150,151].

Dotychczas przeprowadzone badania eksperymentalne wykazują, że EV zawierają różne bioaktywne lipidy, białka, miRNA, a nawet mRNA, które przenoszą między komórkami uczestniczącymi w komunikacji międzykomórkowej [149,150, 152, 153, 154,]. EV i mogą być internalizowane przez komórki przy wykorzystaniu różnych endocytarnych szlaków (np. endocytoza zależna od klatryny [155,156]) i szlaków niezależnych od klatryny (np. makropinocytoza [157,158,159], fagocytoza [157,160], pobieranie za pośrednictwem kaweoliny [157,161,162,163], internalizacja za pośrednictwem tratwy lipidowej [164,165,166]). Glikoproteiny (tj. HSPG [167]) i białka (tj. tetraspaniny [168,169,170,171], integryny [172,173]) obecne na powierzchni EV i na powierzchni komórek docelowych są znane z określania mechanizmu wychwytu. Jednakże dokładne molekularne mechanizmy internalizacji EV i ich dalsze losy są nadal nieznane.

Przeprowadzone przez nas eksperymenty potwierdziły zdolność EV do internalizacji. Główną lokalizacją pęcherzyków po przyłączeniu się do komórek docelowych były okolice okołojądrowe. Wyniki te są zgodne z wynikami uzyskanymi przez Mantel i wsp., którzy zaobserwowali okołojądrową lokalizację mikropęcherzyków pochodzących z czerwonych krwinek w komórkach śródbłonna szpiku kostnego (BMEC) [174]. Lombardo i in. również zaobserwowali internalizację śródbłonkowych EV przez komórki śródbłonna [175].

18.5. Wpływ hiperglikemicznej dawki D-glukozy na kolokalizację uPAR/ beta-katenina oraz ekspresje genów związanych z fibrynolizą oraz szlakiem sygnalizacyjnym Wnt.

Przeprowadzone badania wykazały brak występowania kolokalizacji między uPAR oraz beta-kateniną w komórkach hodowanych we wszystkich warunkach hodowlanych. Lokalizacja uPAR jest zgodna z wynikami uzyskanymi przez S. V. Brodsky'ego i wsp. [176], F. Mahdi i wsp. [177] oraz JS Rao i wsp. [178]. Lokalizację beta-kateniny w złączach szczelinowych potwierdzili również A. Harazin i wsp. pracując na ludzkich komórkach śródbłonna mózgu [179] oraz Kwang-il Kim i wsp. pracujący na linii komórkowej HUVEC [180].

Hiperglikemia zwiększała ekspresję genu PLAUR w obu liniach komórkowych. Podobną zależność wykazano w hodowli linii komórkowej nowotworu piersi MDA-MB-231 [181] oraz na mysim modelu cukrzycy wywołanym streptozotocyną [182]. Natomiast spadek ekspresji uPAR zaobserwowano w ranach u pacjentów z hiperglikemią [183].

Przeprowadzone pomiary qPCR wykazały zróżnicowany wpływ hiperglikemii na ekspresję CTNB1 w zależności od linii komórkowej. Badania przeprowadzone przez Park SJ i wsp. wykazały indukcję cytoplazmatycznej redystrybucji beta-kateniny i zahamowanie produkcji beta-kateniny na poziomie transkrypcyjnym i potranslacyjnym pod wpływem hiperglikemii, co może prowadzić do rozwoju dysfunkcji nerek w stanach cukrzycowych [184].

Wyniki dla obu linii komórkowych wykazały wzrost ekspresji genu GSK-3 β i zahamowanie ekspresji genu LEF1. Su D i wsp. zaobserwowali spadek fosforylacji GSK-3 β w kardiomiocytach hodowanych w warunkach wysokiego stężenia glukozy oraz tkankach serca potomstwa szczurów z cukrzycą *in vitro* i *in vivo* [185].

19. WNIOSKI

1. Możliwe jest opracowanie protokołu izolacji EV w oparciu o model teoretyczny , przy czym uzyskanie homogennej subpopulacji ektosomów oraz egzosomów wymaga walidacji w warunkach doświadczalnych oraz jest utrudnione ze względu na niewielką różnicę wielkości (średnica), a dodatkowo silne właściwości agregujące EV (w przypadku EV izolowanych z komórek śródbłónka).
2. Mikropęcherzyki pochodzenia śródbłonkowego wykazują właściwości fibrynolityczne, co sugeruje ich potencjalną rolę w fizjologicznym utrzymaniu hemostazy oraz w rozwoju chorób związanych z dysfunkcją śródbłónka.
3. Hiperglikemia wpływa nie tylko na produkcję mikropęcherzyków, ale również wychwyt (internalizację) mikropęcherzyków co może się wiązać z modyfikacją ekspresji genów szlaku sygnalizacyjnego Wnt i uPAR
4. Hiperglikemia w zróżnicowany sposób oddziałuje na komórki śródbłónka różnego pochodzenia (tzn. śródbłonek mikronaczyń/makronaczyń) modyfikując ekspresję genów i białek związanych ze szlakiem sygnalizacyjnym Wnt zależnym od beta- kateniny oraz fibrynolizą.

20. SUPLEMENTY

20.1. Wydruk programu do modelu części teoretycznej.

Ze względu na załączenie pełnego algorytmu na płytce, do suplementu zamieszczam przydatne oznaczenia skrótów:

```
Real, Parameter :: Pi = 3.14159265359

Integer NbR                                ! Ilosc rotorów
Real    R_Max(2),R_Min(2),Fi_Tube(2),Theta(2) ! parametry [cm] ROTOR 1 i=1, ROTOR 2 i=2
Real    dd,Deltad,d(2),d_START              ! srednice mikropecherzykow [nm]
Real    Ro,RoMax,RoMin,Ro_Solv              ! gestosci mikropecherzykow i medium [g/cm3],
Real    EtaMax,EtaMin,Eta                  ! lepkość medium [cP]
                                           ! 1 P = 1 dyn·s/cm2 = 1 g·cm-1·s-1, cP - centy Puaz
Real    t(2)                               ! czas wirowania [min]
Real    RPM(2), RPM_I(6)                   ! Ilosc obrotow na minute
Real    Pell(2),Pell_Res(6000,6), Pell_Res0(6000,6) ! wydajność wirowania

Real    R_AV(2),Delta_Ro,L(2),Omega2(2),v(2),X(2),Gen,NP2000(300)
Real    MaxV(300,6), MinV(300,6), MaxV0(300,6),MinV0(300,6)
Real    D_CutOf(300,6), X_Ro(300,6), X_Eta(300,6)
Integer i,j,k,m,ll
```

20.2. Wyniki wylosowanych wartości gęstości mikropecherzyków oraz lepkości medium.

Lepkość medium przy izolacji egzosomów:

Pell3	Pell5	Pell7	Pell10	Pell12	Pell18
0.143076E-01	0.125873E-01	0.108558E-01	0.124288E-01	0.133400E-01	0.119417E-01
0.146436E-01	0.143658E-01	0.105546E-01	0.149923E-01	0.124941E-01	0.128010E-01
0.110254E-01	0.128090E-01	0.124855E-01	0.139333E-01	0.112883E-01	0.136701E-01
0.114546E-01	0.146046E-01	0.146310E-01	0.126325E-01	0.142078E-01	0.100288E-01
0.101351E-01	0.140490E-01	0.125827E-01	0.149111E-01	0.109334E-01	0.135089E-01
0.129154E-01	0.113659E-01	0.141574E-01	0.145820E-01	0.104794E-01	0.108485E-01
0.132254E-01	0.146846E-01	0.143426E-01	0.128183E-01	0.104134E-01	0.101303E-01
0.103057E-01	0.105683E-01	0.118430E-01	0.149241E-01	0.106208E-01	0.122261E-01
0.102214E-01	0.139631E-01	0.128370E-01	0.109165E-01	0.101037E-01	0.104725E-01
0.102062E-01	0.118172E-01	0.126304E-01	0.134707E-01	0.102949E-01	0.128770E-01
0.102315E-01	0.103633E-01	0.128362E-01	0.103525E-01	0.113402E-01	0.126069E-01
0.148426E-01	0.149640E-01	0.100859E-01	0.133274E-01	0.132158E-01	0.106004E-01
0.132167E-01	0.133336E-01	0.110630E-01	0.141309E-01	0.129350E-01	0.112880E-01
0.135231E-01	0.135302E-01	0.144020E-01	0.142750E-01	0.133407E-01	0.145137E-01
0.149131E-01	0.104647E-01	0.143702E-01	0.108739E-01	0.149799E-01	0.118218E-01
0.111804E-01	0.122802E-01	0.114472E-01	0.107642E-01	0.106824E-01	0.138287E-01
0.124393E-01	0.127030E-01	0.107549E-01	0.133943E-01	0.142540E-01	0.104913E-01
0.122141E-01	0.131876E-01	0.103823E-01	0.135049E-01	0.104039E-01	0.100924E-01
0.121518E-01	0.104147E-01	0.119620E-01	0.102424E-01	0.134029E-01	0.122469E-01
0.149553E-01	0.115801E-01	0.122598E-01	0.117244E-01	0.139277E-01	0.124097E-01

Gęstości egzosomów:

Pell3	Pell5	Pell7	Pell10	Pell12	Pell18
0.114760E+01	0.126687E+01	0.116568E+01	0.115087E+01	0.116160E+01	0.119884E+01
0.118890E+01	0.127518E+01	0.126544E+01	0.112614E+01	0.114490E+01	0.129290E+01
0.129995E+01	0.115946E+01	0.115751E+01	0.115108E+01	0.124762E+01	0.116176E+01
0.125469E+01	0.113485E+01	0.124168E+01	0.114552E+01	0.119189E+01	0.124406E+01
0.121924E+01	0.110851E+01	0.121949E+01	0.125077E+01	0.112969E+01	0.124245E+01
0.111982E+01	0.118298E+01	0.116433E+01	0.115749E+01	0.118775E+01	0.125112E+01
0.129326E+01	0.114903E+01	0.124030E+01	0.127796E+01	0.121275E+01	0.115783E+01
0.123928E+01	0.128199E+01	0.112158E+01	0.121433E+01	0.124450E+01	0.112856E+01
0.124295E+01	0.112444E+01	0.128273E+01	0.128316E+01	0.126939E+01	0.128502E+01
0.117278E+01	0.123942E+01	0.114556E+01	0.124315E+01	0.124126E+01	0.117540E+01
0.114059E+01	0.119802E+01	0.126946E+01	0.114980E+01	0.112473E+01	0.128079E+01
0.114684E+01	0.116817E+01	0.124951E+01	0.127391E+01	0.129070E+01	0.124408E+01
0.128686E+01	0.110476E+01	0.124405E+01	0.123281E+01	0.120126E+01	0.116068E+01
0.119326E+01	0.117962E+01	0.110302E+01	0.125391E+01	0.122465E+01	0.117640E+01
0.121570E+01	0.118724E+01	0.127159E+01	0.128744E+01	0.116634E+01	0.114163E+01
0.110639E+01	0.112784E+01	0.127409E+01	0.120534E+01	0.118525E+01	0.126808E+01
0.127766E+01	0.122347E+01	0.121962E+01	0.126872E+01	0.125520E+01	0.127688E+01
0.117877E+01	0.127693E+01	0.119471E+01	0.123374E+01	0.120700E+01	0.116140E+01
0.121095E+01	0.123960E+01	0.112496E+01	0.120766E+01	0.121233E+01	0.124649E+01
0.129588E+01	0.129487E+01	0.113868E+01	0.128627E+01	0.118602E+01	0.127523E+01

Lepkość medium przy wirowaniu ektosomów:

Pel13	Pel15	Pel17	Pel110	Pel112	Pel118
0.143076E-01	0.125873E-01	0.108558E-01	0.124288E-01	0.133400E-01	0.119417E-01
0.146436E-01	0.143658E-01	0.105546E-01	0.149923E-01	0.124941E-01	0.128010E-01
0.110254E-01	0.128090E-01	0.124855E-01	0.139333E-01	0.112883E-01	0.136701E-01
0.114546E-01	0.146046E-01	0.146310E-01	0.126325E-01	0.142078E-01	0.100288E-01
0.101351E-01	0.140490E-01	0.125827E-01	0.149111E-01	0.109334E-01	0.135089E-01
0.129154E-01	0.113659E-01	0.141574E-01	0.145820E-01	0.104794E-01	0.108485E-01
0.132254E-01	0.146846E-01	0.143426E-01	0.128183E-01	0.104134E-01	0.101303E-01
0.103057E-01	0.105683E-01	0.118430E-01	0.149241E-01	0.106208E-01	0.122261E-01
0.102214E-01	0.139631E-01	0.128370E-01	0.109165E-01	0.101037E-01	0.104725E-01
0.102062E-01	0.118172E-01	0.126304E-01	0.134707E-01	0.102949E-01	0.128770E-01
0.102315E-01	0.103633E-01	0.128362E-01	0.103525E-01	0.113402E-01	0.126069E-01
0.148426E-01	0.149640E-01	0.100859E-01	0.133274E-01	0.132158E-01	0.106004E-01
0.132167E-01	0.133336E-01	0.110630E-01	0.141309E-01	0.129350E-01	0.112880E-01
0.135231E-01	0.135302E-01	0.144020E-01	0.142750E-01	0.133407E-01	0.145137E-01
0.149131E-01	0.104647E-01	0.143702E-01	0.108739E-01	0.149799E-01	0.118218E-01
0.111804E-01	0.122802E-01	0.114472E-01	0.107642E-01	0.106824E-01	0.138287E-01
0.124393E-01	0.127030E-01	0.107549E-01	0.133943E-01	0.142540E-01	0.104913E-01
0.122141E-01	0.131876E-01	0.103823E-01	0.135049E-01	0.104039E-01	0.100924E-01
0.121518E-01	0.104147E-01	0.119620E-01	0.102424E-01	0.134029E-01	0.122469E-01
0.149553E-01	0.115801E-01	0.122598E-01	0.117244E-01	0.139277E-01	0.124097E-01

Gęstość ektosomów:

Pel13	Pel15	Pel17	Pel110	Pel112	Pel118
0.114760E+01	0.126687E+01	0.116568E+01	0.115087E+01	0.116160E+01	0.119884E+01
0.118890E+01	0.127518E+01	0.126544E+01	0.112614E+01	0.114490E+01	0.129290E+01
0.129995E+01	0.115946E+01	0.115751E+01	0.115108E+01	0.124762E+01	0.116176E+01
0.125469E+01	0.113485E+01	0.124168E+01	0.114552E+01	0.119189E+01	0.124406E+01
0.121924E+01	0.110851E+01	0.121949E+01	0.125077E+01	0.112969E+01	0.124245E+01
0.111982E+01	0.118298E+01	0.116433E+01	0.115749E+01	0.118775E+01	0.125112E+01
0.129326E+01	0.114903E+01	0.124030E+01	0.127796E+01	0.121275E+01	0.115783E+01
0.123928E+01	0.128199E+01	0.112158E+01	0.121433E+01	0.124450E+01	0.112856E+01
0.124295E+01	0.112444E+01	0.128273E+01	0.128316E+01	0.126939E+01	0.128502E+01
0.117278E+01	0.123942E+01	0.114556E+01	0.124315E+01	0.124126E+01	0.117540E+01
0.114059E+01	0.119802E+01	0.126946E+01	0.114980E+01	0.112473E+01	0.128079E+01
0.114684E+01	0.116817E+01	0.124951E+01	0.127391E+01	0.129070E+01	0.124408E+01
0.128686E+01	0.110476E+01	0.124405E+01	0.123281E+01	0.120126E+01	0.116068E+01
0.119326E+01	0.117962E+01	0.110302E+01	0.125391E+01	0.122465E+01	0.117640E+01
0.121570E+01	0.118724E+01	0.127159E+01	0.128744E+01	0.116634E+01	0.114163E+01
0.110639E+01	0.112784E+01	0.127409E+01	0.120534E+01	0.118525E+01	0.126808E+01
0.127766E+01	0.122347E+01	0.121962E+01	0.126872E+01	0.125520E+01	0.127688E+01
0.117877E+01	0.127693E+01	0.119471E+01	0.123374E+01	0.120700E+01	0.116140E+01
0.121095E+01	0.123960E+01	0.112496E+01	0.120766E+01	0.121233E+01	0.124649E+01
0.129588E+01	0.129487E+01	0.113868E+01	0.128627E+01	0.118602E+01	0.127523E+01

20.3. Obliczenia wydajności sedymentacji albuminy i fibrynogenu.

Przy użyciu programu załączonego do mojej pracy doktorskiej wyliczyłam wydajność opadania białek osocza do peletu podczas wirowań wybranych do izolacji mikropęcherzyków (Tab.2). Jako przykłady białek wybrałam albuminę oraz fibrynogen, które charakteryzują się

zróżnicowaną masą wyrażoną w kDa. Promień hydrodynamiczny białek zwiniętych oraz rozwiniętych wyliczono przy użyciu aplikacji [¹⁸⁶].

Tabela 4 Masa oraz promień hydrodynamiczny albuminy oraz fibrynogenu.

	Masa [kDa]	Promień hydrodynamiczny białka zwiniętego [nm]	Promień hydrodynamiczny białka rozwiniętego [nm]
Albumina	66,5	3,48	8,53
Fibrynogen	340	5,93	21,6

Pomiary procentu osadzonego białka wykonano przy założeniu iż gęstość białka wynosi: 1,22, 1,35 lub 1,43 g/cm³ [^{187,188,189}].

Tabela 5 Odsetek zsedymetowanej albuminy i fibrynogenu przy wirowaniu 18.000xg oraz 150.000xg.

ρ [g/cm ³]	d_s	Zsedymetowana albumina [%]	Zsedymetowany fibrynogen [%]
Wirowanie 30min, 18 000 xg (białko zwinięte / białko rozwinięte)			
1,22	176	0 / 0	0/0.02
1,35	140	0/0	0/0.03
1,43	126	0/0.01	0/0.04
Ultrawirowanie, 90min, 150 000xg (białko zwinięte / białko rozwinięte)			
1,22	31	0.01/0.09	5/0.57
1,35	24	0.02/ 0.08	0.14/0.85
1,43	22	0.02/0.17	0.9/0.97

Ze względu na fakt podwójnego wirowania, wydajność osadzania egzosomów wyliczono w oparciu o wzór (5).

Tabela 6 Odsetek zsedymetowanej albuminy i fibrynogenu po uwzględnieniu podwójnego wirowania.

Ultrawirowanie, 90min, 150 000xg z uwzględnieniem wzoru 5 (białko zwinięte / białko rozwinięte)	
0.01/0.09	0.05/0.56
0.02/ 0.08	0.14/ 0.82
0.02/0.17	0.09/0.93

21. SPIS TABEL

Tabela 1 Porównanie trzech populacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.	15
Tabela 2 Parametry rotorów, wirowania oraz parametry fizyczne medium i mikro-pęcherzyków.....	46
Tabela 3 Wartość ciśnienia i napięcia przy przeprowadzonej kalibracji nanoporu.	47
Tabela 4 Masa oraz promień hydrodynamiczny albuminy oraz fibrynogenu.	89
Tabela 5 Odsetek zsedymetowanej albuminy i fibrynogenu przy wirowaniu 18.000xg oraz 150.000xg.	89
Tabela 6 Odsetek zsedymetowanej albuminy i fibrynogenu po uwzględnieniu podwójnego wirowania.	90

22. SPIS ILUSTRACJI:

Rysunek 1 Schemat powstawania ektosomów oraz egzosomów. Przygotowano w oparciu o rysunek wykonany przez E. Stępień [].	14
Rysunek 2 Biogeneza egzosomów. Rysunek przygotowany w oparciu o rysunek wykonany przez I.J. McGough []. Egzosomy powstają z endosomalnego kompartmentu komórki. Po internalizacji endosomy przemieszczają się do wnętrza komórki i łączą ze sobą tworząc RAB5-dodatnie wczesne endosomy. Wewnętrzne pączkowanie błony endosomalnej jest napędzane przez kompleks ESCRT lub domeny bogate w ceramid, co prowadzi do tworzenia pęcherzyków światła endosomów, które są nazywane późnymi endosomami lub ciałami wielopęcherzykowymi (MVB). Ładunek, inaczej nazywany cargo, może być następnie skierowany do lizosomu (gdzie ulega degradacji w kwaśnym lizosomalnym środowisku []) lub MVB mogą być transportowane do błony plazmatycznej (poprzez aktywność RAB11, 27 lub 35), gdzie ulegają fuzji z błoną komórkową za pośrednictwem białek SNARE, takich jak YKT6 i VAMP7, co skutkuje uwolnieniem egzosomów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (egzocytoza).	18
Rysunek 3 Schemat budowy ektosomu. Opracowany w oparciu o rysunek wykonany przez E. Stępień [].	19
Rysunek 4 Schemat transferu RNA oraz białek przy użyciu mikropęcherzyków. Przygotowane w oparciu o rysunek przygotowany przez G Raposo [¹]. Białka związane z błoną (trójkąty) oraz przezbłonowe (prostokąty) i RNA (zakrzywione symbole) są selektywnie włączane.	22
Rysunek 5 Przestrzenny model uPAR z przyłączoną cząsteczką uPA, przygotowany w oparciu o strukturę krystaliczną określoną z rozdzielczością 1,9 Å (kod PDB: 2FD6).	26
Rysunek 6 Funkcjonalne interakcje uPAR-uPA w fizjologii komórki. Przygotowano w oparciu o rysunek wykonany przez M Durak-Kozica [].	26
Rysunek 7 Szlak sygnalizacyjny Wnt podczas nieobecności liganda (A) oraz po przyłączeniu ligandu Wnt (B). Przygotowaniu w oparciu o rysunek wykonany przez M. Durak-Kozica [].	29
Rysunek 8 Schemat przedstawiający rozkład gęstości w zależności od promienia w rotorze stałokątowym (FA). Przygotowano w oparciu o rysunek wykonany przez MA Livshitsa [¹¹¹].	33
Rysunek 9 A.- Sprzęt qNano, B. - Schemat przejścia cząsteczek przez nanopor na skutek przyłożonego napięcia i ciśnienia, C. - Przykładowy wynik pomiaru, na podstawie którego można wyliczyć stężenie oraz średnice cząsteczek. Przygotowano w oparciu o rysunek wykonany przez ELCJ Blundell [].	36
Rysunek 10 Schematyczna definicja potencjału zeta i podwójnej warstwy elektrycznej otaczającej cząstkę w roztworze elektrolitu. Przygotowaniu w oparciu o Malvern 2007.	39

Rysunek 11 Schemat działania cytometrii przepływowej. Opracowane w oparciu o rysunek wykonany przez Kibria G [].....	41
Rysunek 12 Schemat izolacji mikropęcherzyków do porównania z modelem teoretycznym.	45
Rysunek 13A – Wydajności wirowania obliczone na podstawie modelu dla ektosomów (linia ciągła) i egzosomów (linia przerywana) obliczone z zależności (4) i (5) na podstawie danych zawartych w Tab.2, B – wyjściowy rozkład koncentracji mikropęcherzyków wyznaczony dzięki pomiarom qNano, C i D przewidywane na podstawie modelu rozkładu koncentracji ektosomów i egzosomów. Obszary dla poszczególnych wartości względnej siły odśrodkowej zawarte są pomiędzy najwyższym i najniższym z zaznaczonych punktów pomiarowych.....	56
Rysunek 14 Porównanie wyników modelowych z pomiarami qNano (TRPS) dla ektosomów. Błąd pomiarowy przedstawiony na rysunku wynosi ± 10 nm.	56
Rysunek 15 Porównanie wyników modelowych z pomiarami qNano (TRPS) dla egzosomów. Błąd pomiarowy oszacowano na ± 10 nm.....	57
Rysunek 16 Zależność wielkości cząsteczek od ζ -potencjału. A. Ektosomy, B. Egzosomy.	57
Rysunek 17 Przykładowe zdjęcia ektosomów (A,C) i egzosomów (B,D) wyizolowanych z linii komórkowej TIME (A,B) oraz HUVEC (C,D).	58
Rysunek 18 Rozkład wielkości ektosomów (A,C) i egzosomów (B,D) wyizolowanych z linii komórkowej TIME (A,B) oraz HUVEC (C,D) z dopasowaniem LogNormal zaznaczonym na czerwono.	59
Rysunek 19 Podwójna błona komórkowa mikropęcherzyków widoczna w mikroskopii TEM na przykładzie próbki egzosomów TIME.	60
Rysunek 20 Wykresy koncentracji (A,D), średniej wielkości (B,E) oraz wartości modalnej (C,F) mikropęcherzyków izolowanych odpowiednio z HUVEC (A,B,C) oraz TIME (D,E,F) izolowanych z warunków normoglikemicznych, hiperglikemicznych oraz kontroli osmomolarnej.....	61
Rysunek 21 A. Turbidymetryczny test tworzenia skrzepu. B. Aktywność fibrynolityczna urokinazy. C.D. Aktywność fibrynolityczna egzosomów i ektosomów wyizolowanych z komórek śródbłónka (HUVEC i TIME odpowiednio).....	63
Rysunek 22 Aktywność uPA w EV wyizolowanych z TIME (A) oraz HUVEC (B).	63
Rysunek 23 Przykładowe wykresy z cytometrii przepływowej do analizy markerów powierzchniowych. A Kalibrator, B. Ektosomy bez barwienia, C. Kontrola izotypowa IgG1, D. kontrola izotopowa IgG2, E. CD87, F. CD63, G. CD151, H. aneksyna V, I. Wnt3a.	64
Rysunek 24 Analiza % ekspresji uPAR (A), aneksyny V (B), CD151 (C), CD63 (D) oraz Wnt3a (E) na powierzchni mikropęcherzyków izolowanych z linii komórkowej TIME.	66

Rysunek 25 Analiza % ekspresji uPAR (A), aneksyny V (B), CD151 (C), CD63 (D) oraz Wnt3a (E) na powierzchni mikropęcherzyków izolowanych z linii komórkowej HUVEC. ...	67
Rysunek 26 Ekspresja uPAR w komórkach i pęcherzykach linii komórkowej TIME.	68
Rysunek 27 Ekspresja beta-kateniny w komórkach i pęcherzykach linii komórkowej TIME.	69
Rysunek 28 Ekspresja uPAR w komórkach i pęcherzykach linii komórkowej HUVEC.	70
Rysunek 29 Ekspresja beta-kateniny w komórkach i pęcherzykach linii komórkowej HUVEC.	71
Rysunek 30 Internalizacja EV izolowanych z komórek TIME.....	72
Rysunek 31 Internalizacja EV izolowanych z komórek HUVEC.....	73
Rysunek 32 Barwienie fluorescencyjne uPAR oraz beta-kateniny na komórkach HUVEC hodowanych w warunkach normo- oraz hiperglikemii oraz kontroli osmomolarnej.	75
Rysunek 33 Barwienie fluorescencyjne uPAR oraz beta-kateniny na komórkach TIME hodowanych w warunkach normo- oraz hiperglikemii oraz kontroli osmomolarnej.	76
Rysunek 34 Ekspresja genów w warunkach normoglikemii, hiperglikemii oraz kontroli osmomolarnej dla linii komórkowej TIME. A. PLAUR, B. CTNB1, C.GSK-3 β , D. LEF1, ..	76
Rysunek 35 Ekspresja genów w warunkach normoglikemii, hiperglikemii oraz kontroli osmomolarnej dla linii komórkowej HUVEC. A. PLAUR, B. CTNB1, C.GSK-3 β , D. LEF1, ..	77

23. SPIS LITERATURY

- ¹ Raposo G., Stoorvogel W., Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol.* 2013;200:373-383
- ² Van der Pol E., Boing A.N., Gool E.L., Nieuwland R., Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles. *J. Thromb. Haemost.* 2016;14:48–56
- ³ Boulanger C.M., Loyer X., Rautou P.E., Amabile N., Extracellular vesicles in coronary artery disease. *Nat. Rev. Cardiol.* 2017;14:259–272
- ⁴ Caby M.P., Lankar D., Vincendeau-Scherrer C., Raposo G., Bonnerot C., Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol.* 2005; 17:879-887
- ⁵ Vella L.J., Sharples R.A., Lawson V.A., Masters C.L., Cappai R., Hill A.F., Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J. Pathol.* 2007;211:582–590
- ⁶ Roman M., Kamińska A., Drożdż A., Platt M., Kuźniewski M., Małecki M.T., Kwiatek W., Paluszkiewicz C., Stępień E.Ł., Raman spectral signatures of urinary extracellular vesicles from diabetic patients and hyperglycemic endothelial cells as potential biomarkers in diabetes. *Nanomedicine* 2019;17:137-149
- ⁷ Kamińska A., Platt M., Kasprzyk J., Kuśnierz-Cabala B., Gala-Błądzińska A., Woźnicka O., Jany B.R., Krok F., Piekoszewski W., Kuźniewski M., Stępień E., Urinary Extracellular Vesicles: Potential Biomarkers of Renal Function in Diabetic Patients. *J. Diabetes Res.* 2016; 2016:1-12
- ⁸ Admyre C., Johansson S.M., Qazi K.R., Filén J.J., Lahesmaa R., Norman M., Neve E.P., Scheynius A., Gabrielsson S., Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *J Immunol.* 2007; 179:1969-1978
- ⁹ Mirza A.H., Kaur S., Nielsen L.B., Størling J., Yarani R., Roursgaard M., Mathiesen E.R., Damm P., Svare J., Mortensen H.B., Pociot F., Breast Milk-Derived Extracellular Vesicles Enriched in Exosomes From Mothers With Type 1 Diabetes Contain Aberrant Levels of microRNAs, *Front. Immunol.*, 2019;10:2543
- ¹⁰ Park K.H., Kim B.J., Kang J., Nam T.S., Lim J.M., Kim H.T., Park J.K., Kim Y.G., Chae S.W., Kim U.H., Ca²⁺ signaling tools acquired from prostasomes are required for progesterone-induced sperm motility. *Sci Signal.* 2011;4:31

-
- ¹¹ Aalberts M., van Dissel-Emiliani F.M., van Adrichem N.P., van Wijnen M., Wauben M.H., Stout T.A., Stoorvogel W., Identification of distinct populations of prostasomes that differentially express prostate stem cell antigen, annexin A1, and GLIPR2 in humans. *Biol. Reprod.* 2012;86:82
- ¹² Andre F., Scharzt N.E., Movassagh M., Flament C., Pautier P., Morice P., Pomel C., Lhomme C., Escudier B, Le Chevalier T, Tursz T, Amigorena S, Raposo G, Angevin E, Zitvogel L. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet.* 2002; 360:295-305
- ¹³ Ogawa Y., Miura Y., Harazono A., Kanai-Azuma M., Akimoto Y., Kawakami H., Yamaguchi T., Toda T., Endo T., Tsubuki M., Yanoshita R., Proteomic analysis of two types of exosomes in human whole saliva. *Biol Pharm Bull.* 2011; 34:13-23
- ¹⁴ Asea A., Jean-Pierre C., Kaur P., Rao P., Linhares I.M., Skupski D., Witkin S.S., Heat shock protein-containing exosomes in mid-trimester amniotic fluids. *J Reprod Immunol.* 2008; 79:12-17
- ¹⁵ Masyuk A.I, Huang B.Q., Ward C.J., Gradilone S.A., Banales J.M., Masyuk T.V., Radtke B., Splinter P.L., LaRusso N.F., Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010; 299:990-999
- ¹⁶ Stępień E., Targosz-Korecka M., Mikrocząstki w regulacji funkcji śródbłónka, *Postępy Biochemii.* 2013; 59: 395-404
- ¹⁷ Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J., Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication. *J Proteomics.* 2010; 73:1907–1920
- ¹⁸ Yuan Z., Yunfeng L., Haiying L., Wai H.T., Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential, *Cell & Bioscience.* 2019; 9:19
- ¹⁹ Valenti R., Huber V., Iero M., Filipazzi P., Parmiani G., Rivoltini L. Tumor-released microvesicles as vehicles of immunosuppression. *Cancer Res.* 2007; 67:2912–2915
- ²⁰ Herrera M.B., Fonsato V., Gatti S., Deregibus M.C., Sordi A., Cantarella D., Calogero R., Bussolati B., Tetta C., Camussi G., Human liver stem cell-derived microvesicles accelerate hepatic regeneration in hepatectomized rats. *J Cell Mol Med.* 2010; 14:1605–1618
- ²¹ Atkin-Smith G.K., Paone S., Zanker D.J., Duan M., Phan T.K., Chen W., Hulett M.D., Poon I.K., Isolation of cell type-specific apoptotic bodies by fluorescence-activated cell sorting. *Sci Rep.* 2017; 7:39846

-
- ²² Sun W., Zhao C., Li Y., Wang L., Nie G., Peng J., Wang A., Zhang P., Tian W., Li Q., Song J., Wang C., Xu X., Tian, Y., Zhao D., Xu Z., Zhong G., Han B., Ling S., Chang Y.Z., Li Y., Osteoclast-derived microRNA-containing exosomes selectively inhibit osteoblast activity. *Cell Discov.* 2016; 2:16015
- ²³ Xie Y., Chen Y., Zhang L., Ge W., Tang P., The roles of bone-derived exosomes and exosomal microRNAs in regulating bone remodelling. *J Cell Mol Med.* 2017; 21:1033–1041
- ²⁴ Deregibus M.C., Cantaluppi V., Calogero R., Lo Iacono M., Tetta C., Biancone L., Bruno S., Bussolati B., Camussi G., Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood.* 2007; 110:2440–2448
- ²⁵ Collino F., Deregibus M.C., Bruno S., Sterpone L., Aghemo G., Viltono L., Tetta C., Camussi G., Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS One.* 2010; 5:11803
- ²⁶ Hashimoto S., Ochs R.L., Rosen F., Quach J., McCabe G., Solan J., Seegmiller J.E., Terkeltaub R., Lotz M., Chondrocyte-derived apoptotic bodies and calcification of articular cartilage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:3094–3099
- ²⁷ Kirsch T., Wang W., Pfander D., Functional differences between growth plate apoptotic bodies and matrix vesicles. *J Bone Miner Res.* 2003; 18:1872–1881
- ²⁸ Stuart M.C., Damoiseaux J.G., Frederik P.M., Arends J.W., Reutelingsperger C.P., Surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis of rat thymocytes precedes nuclear changes. *Eur J Cell Biol.* 1998; 76:77–83
- ²⁹ Trajkovic K., Hsu C., Chiantia S., Rajendran L., Wenzel D., Wieland F., Schwille P., Brügger B., Simons M., Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science.* 2008; 319:1244–1247
- ³⁰ Subra C., Laulagnier K., Perret B., Record M., Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie.* 2007; 89:205–212
- ³¹ Vidal M., Sainte-Marie J., Philippot J.R., Bienvenue A., Asymmetric distribution of phospholipids in the membrane of vesicles released during in vitro maturation of guinea pig reticulocytes: evidence precluding a role for “aminophospholipid translocase”. *J Cell Physiol.* 1989; 140:455–462

-
- ³² Bucki R., Bachelot-Loza C., Zachowski A., Giraud F., Sulpice J.C., Calcium induces phospholipid redistribution and microvesicle release in human erythrocyte membranes by independent pathways. *Biochemistry*. 1998; 37:15383–15391
- ³³ Scott S., Pendlebury S.A., Green C., Lipid organization in erythrocyte membrane microvesicles. *Biochem J*. 1984; 224:285–290
- ³⁴ Heijnen H.F., Schiel A.E., Fijnheer R., Geuze H.J., Sixma J.J., 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; 94:3791–3799
- ³⁵ Zwaal R.F., Comfurius P., Bevers E.M., Platelet procoagulant activity and microvesicle formation. Its putative role in hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta*. 1992; 1180:1–8
- ³⁶ Cocucci E., Meldolesi J., Ectosomes and exosomes: Shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol*. 2015; 25: 364–372
- ³⁷ Hafiane A., Daskalopoulou S.S., Extracellular vesicles characteristics and emerging roles in atherosclerotic cardiovascular disease. *Metabolism* 2018; 85: 213–222
- ³⁸ Bissig, C., Gruenberg J., ALIX and the multivesicular endosome: ALIX in Wonderland. *Trends Cell Biol*. 2014;24: 19–25
- ³⁹ Trajkovic K., Hsu C., Chiantia S., Rajendran L., Wenzel D., Wieland F., Schwille P., Brugger B., Simons M., Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* 2008; 319: 1244–1247
- ⁴⁰ Hessvik N.P., Llorente A., Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell. Mol. Life Sci*. 2018;75: 193–208
- ⁴¹ Juan T., Furthauer M., Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles. *Semin. Cell Dev. Biol*. 2018; 74: 66–77
- ⁴² Kowal J., Tkach M., Thery C., Biogenesis and secretion of exosomes. *Curr. Opin. Cell Biol*. 2014; 29: 116–125
- ⁴³ McGough I.J., Vincent J.P., Exosomes in developmental signaling. *Development*. 2016; 143: 2482-2493
- ⁴⁴ Luzio J.P., Poupon V., Lindsay M.R., Mullock B.M., Piper R.C., Pryor P.R., Membrane dynamics and the biogenesis of lysosomes. *Mol. Membr. Biol*. 2003; 20: 141-154
- ⁴⁵ Wolf P., The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol*. 1967; 13: 269–288

-
- ⁴⁶ Konkolewska M. , Kurc S., Stępień E., A thousand words about microparticles in cardiology. *J Med Sci* 2014; 83: 189-193
- ⁴⁷ Stachowiak J.C., Brodsky F.M., Miller E.A., A cost-benefit analysis of the physical mechanisms of membrane curvature. *Nat. Cell Biol.* 2013; 15: 1019–1027
- ⁴⁸ Cocucci, E., Meldolesi, J., Ectosomes and exosomes: Shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends Cell Biol.* 2015;25: 364–372
- ⁴⁹ Nabhan J.F., Hu R., Oh R.S., Cohen S.N., Lu Q., Formation and release of arrestin domain-containing protein 1-mediated microvesicles (ARMMs) at plasma membrane by recruitment of TSG101 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012; 109: 4146–4151
- ⁵⁰ Tricarico C., Clancy J., D’Souza-Schorey C., Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases* 2017; 8: 220–232
- ⁵¹ Muralidharan-Chari V., Clancy J., Plou C., Romao M., Chavrier P., Raposo G., D’Souza-Schorey C., ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr. Biol.* 2009; 19:1875–1885
- ⁵² Paone S., Baxter A.A., Hulett M.D., Poon I.K.H., Endothelial cell apoptosis and the role of endothelial cell-derived extracellular vesicles in the progression of atherosclerosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 2019;76:1093–1106
- ⁵³ Arandjelovic S., Ravichandran K.S., Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nat. Immunol.* 2015; 16: 907–917
- ⁵⁴ Berda-Haddad Y., Robert S., Salers P., Zekraoui L., Farnarier C., Dinarello C.A., Dignat-George F., Kaplanski G., Sterile inflammation of endothelial cell-derived apoptotic bodies is mediated by Interleukin-1alpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011; 108: 20684–20689
- ⁵⁵ Zerneck A., Bidzhikov K., Noels H., Shagdarsuren E., Gan L., Denecke B., Hristov M., Koppel T., Jahantigh M.N., Lutgens E., Wang S., Olson E.N., Schober A., Weber C., Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci. Signal.* 2009; 2:81
- ⁵⁶ Caruso S., Poon I.K.H., Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles: More Than Just Debris. *Front. Immunol.* 2018; 9: 1486
- ⁵⁷ Rana S., Yue S., Stadel D., Zöller M., Toward tailored exosomes: the exosomal tetraspanin web contributes to target cell selection. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2012; 44:1574–1584

-
- ⁵⁸ Hemler M.E., 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
- ⁵⁹ Montecalvo A., Larregina A.T., Shufesky W.J., Stolz D.B., Sullivan M.L., Karlsson J.M., Baty C.J., Gibson G.A., Erdos G., Wang Z., Milosevic J., Tkacheva O.A., Divito S.J., Jordan R., Lyons-Weiler J., Watkins S.C., Morelli A.E., Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*. 2012; 119:756–766
- ⁶⁰ Morelli A.E., The immune regulatory effect of apoptotic cells and exosomes on dendritic cells: its impact on transplantation. *Am. J. Transplant.* 2006; 6:254–261
- ⁶¹ Barrčs C., Blanc L., Bette-Bobillo P., André S., Mamoun R., Gabius H.J., Vidal M., Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. *Blood*. 2010; 115:696–705
- ⁶² 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; 111:488–496
- ⁶³ Kunihiro N1, Kawai B, Sanjo A, Osaka K, Ohnishi A. Platelet aggregation and coagulation and fibrinolysis parameters in both portal and systemic circulations in patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2001;19:52-59
- ⁶⁴ Kwaan H.C., Lindholm P.F., Fibrin and Fibrinolysis in Cancer. *Semin Thromb Hemost.* 2019;45:413-422
- ⁶⁵ Silva L.M., Lum A.G., Tran C., Shaw M.W., Gao Z., Flick M.J., Moutsopoulos N.M., Bugge T.H., Mullins E.S., Plasmin-mediated fibrinolysis enables macrophage migration in a murine model of inflammation. *Blood*. 2019;134:291-303
- ⁶⁶ Rice V.C.M., Richard-Davis G., Saleh A.A.A., Ginsburg K.A., Mammen E.F., Moghissi K., Leach R., Fibrinolytic parameters in women undergoing ovulation induction. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1993, 169: 1549-1553
- ⁶⁷ Badimon L., Vilahur G., Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med.* 2014;276:618-632
- ⁶⁸ Rau J.C., Beaulieu L.M., Huntington J.A, Church F.C., Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J. Thromb. Haemost.*, 2007; 5: 102-115

-
- ⁶⁹ Chana-Muñoz A., Jendroszek A., Sønnichsen M., Wang T., Ploug M., Jensen J.K., Andreasen P.A., Bendixen C., Panitz F., Origin and diversification of the plasminogen activation system among chordates. *BMC Evol Biol.*, 2019; 19: 27
- ⁷⁰ Foley J.H., Plasminogen at the nexus of fibrinolysis, inflammation, and complement. *Semin. Thromb. Hemost.*, 2017; 43: 135-142
- ⁷¹ Kołodziejczyk J., Talar B., Olas B., Wachowicz B., Urokinase-type plasminogen activator in cancer progression – role, potential applications in diagnostics and anticancer therapy. *Acta Haem. Pol.*, 2011; 42: 619–627
- ⁷² Lijnen H.R., Molecular interactions between the plasminogen/plasmin and matrix metalloproteinase systems. *Fibrinolysis Proteol.*, 2000; 14: 175-181
- ⁷³ Mahmood N., Mihalcioiu C., Rabbani S.A., Multifaceted role of the urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR): diagnostic, prognostic, and therapeutic applications. *Front. Oncol.* 2018; 8: 24
- ⁷⁴ Chapin J.C., Hajjar K.A., Fibrinolysis and the control of blood coagulation. *Blood Rev.*, 2015; 29: 17-24
- ⁷⁵ Dobrovolsky A.B., Titaeva E.V., The fibrinolysis system: regulation of activity and physiologic functions of its amin components. *Biochemistry (Mosc.)*, 2002; 67: 116-126
- ⁷⁶ Bansal V., Roychoudhury P., Production and purification of urokinase: a comprehensive review. *Prot. Expr. Purif.*, 2006; 45: 1-14
- ⁷⁷ Crippa M.P., Urokinase-type plasminogen activator. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007; 39: 690-694
- ⁷⁸ Banys-Paluchowski M., Witzel I., Aktas B., Fasching P.A., Hartkopf A., Janni W., Kasimir-Bauer S., Pantel K., Schön G., Rack B., Riethdorf S., Solomayer E.F., Fehm T., Müller V., The prognostic relevance of urokinase-type plasminogen activator (uPA) in the blood of patients with metastatic breast cancer. *Sci. Rep.*, 2019; 9:2318
- ⁷⁹ Han C., Bellone S., Siegel E.R., Altwerger G., Menderes G., Bonazzoli E., Egawa-Takata T, Pettinella F., Bianchi A., Riccio F., Zammataro L., Yadav G., Marto J.A., Penet M.F., Levine D.A., Drapkin R., Patel A., Litkouhi B., Ratner E., Silasi D.A., Huang G.S., Azodi M., Schwartz P.E., Santin A.D., A novel multiple biomarker panel for the early detection of high-grade serous ovarian carcinoma. *Gynecol. Oncol.*, 2018; 149: 585-591
- ⁸⁰ HorvaticHerceg G., Herceg D., Kralik M., Kulic A., Bence-Zigman Z., Tomic-Brzac H., Bracic I., Kusacic-Kuna S, Prgomet D., Urokinase plasminogen activator and its inhibitor

type-1 as prognostic factors in differentiated thyroid carcinoma patients. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 2013; 149: 533-540

⁸¹ Kanda K., Ueda M., Futakuchi H., Yamaguchi H., Mori K., Terai Y., Ueki M., Transcriptional expression of the genes implicated in angiogenesis and tumor invasion in cervical carcinomas. *Gynecol Oncol.*, 2005;98: 453-461

⁸² Andreasen P.A., Egelund R., Petersen H.H., The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2000; 57: 25-40

⁸³ Manetti M., Allanore Y., Revillod L., Fatini C., Guiducci S., Cuomo G., Bonino C., Riccieri V., Bazzichi L., Liakouli V., Cipriani P., Giacomelli R., Abbate R., Bombardieri S., Valesini G., Montecucco C., Valentini G., Ibba-Manneschi L., Matucci-Cerinic M., A genetic variation located in the promoter region of the UPAR (CD87) gene is associated with the vascular complications of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.*, 2011; 63: 247-256

⁸⁴ Robak E., Gerlicz Z., Wybrane cytokiny proangiogenne w twardzinie układowej. *Postepy Hig. Med. Dośw.*, 2014; 68 : 1472-1482

⁸⁵ Czekay R.P., Kummel T.A., Orlando R.A., Farquhar M.G., Direct binding of occupied urokinase receptor (uPAR) to LDL receptor-related protein is required for endocytosis of uPAR and regulation of cell surface urokinase activity. *Mol. Biol. Cell.*, 2001; 12: 1467–1479

⁸⁶ Cortese K., Sahores M., Madsen C.D., Tacchetti C., Blasi, F., Clathrin and LRP-1-independent constitutive endocytosis and recycling of uPAR. *PLoS ONE.*, 2008; 3: 3730

⁸⁷ Wei C., El Hindi S., Li J., Fornoni A., Goes N., Sageshima J., Maiguel D., Karumanchi S.A., Yap H.K., Saleem M., Zhang Q., Nikolic B., Chaudhuri A., Daftarian P., Salido E., Torres A., Salifu M., Sarwal M.M., Schaefer F., Morath C., Schwenger V., Zeier M., Gupta V., Roth D., Rastaldi M.P., Burke G., Ruiz P., Reiser J., Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat. Med.*, 2011; 17: 952-960

⁸⁸ Llinas P., Le Du M.H., Gårdsvoll H., Danø K., Ploug M., Gilquin B., Crystal structure of the human urokinase plasminogen activator receptor bound to an antagonist peptide. *EMBO J.*, 2005; 24: 1655-1663

⁸⁹ Holst-Hansen C., Johannessen B., Høyer-Hansen G., Rømer J., Ellis V., Brünner N., Urokinase-type plasminogen activation in three human breast cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Clin. Exp. Metastasis.* 1996; 14: 297-307

-
- ⁹⁰ Sitrin R.G., Pan P.M., Harper H.A., Blackwood R.A., Todd R.F. 3rd, Harsh D.M., Blackwood R.A., Clustering of urokinase receptors (uPAR; CD87) induces proinflammatory signaling in human polymorphonuclear neutrophils. *J. Immunol.*, 2000; 165: 3341-3349
- ⁹¹ Durak-Kozica M., Enguita F.J., Stępień E., Targeting uPAR in diabetic vascular pathologies. *Postepy Hig Med Dosw*, 2019; 73: 803–808
- ⁹² Behzadian M.A., Windsor L.J., Ghaly N., Liou G., Tsai N.-T., Caldwell R.B., VEGF-induced paracellular permeability in cultured endothelial cells involves urokinase and its receptor. *FASEB J.*, 2003; 17: 753-754
- ⁹³ Esser S., Lampugnani M.G., Corada M., Dejana E., Risau W., Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J. Cell. Sci.*, 1998; 111: 1853-1865
- ⁹⁴ Abid Hussein M.N., Meesters E.W., Osmanovic N., Romijn F.P., Nieuwland R., Sturk A., Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection ex vivo. *J. Thromb. Haemost.*, 2003; 1: 2434-2443
- ⁹⁵ Brodsky S.V., Malinowski K., Golightly M., Jesty J., Goligorsky M.S., Plasminogen activator inhibitor-1 promotes formation of endothelial microparticles with procoagulant potential. *Circulation*, 2002; 106: 2372-2378
- ⁹⁶ Wang L., Bi Y., Yu M., Li T., Tong D., Yang X., Phosphatidylserine-exposing blood cells and microparticles induce procoagulant activity in non-valvular atrial fibrillation. *Int. J. Cardiol.*, 2018; 258: 138-143
- ⁹⁷ Lacroix R., Sabatier F., Mialhe A., Basire A., Pannell R., Borghi H., Robert S., Lamy E., Plawinski L., Camoin-Jau L., Gurewich V., Angles-Cano E., Dignat-George F., Activation of plasminogen into plasmin at the surface of endothelial microparticles: a mechanism that modulates angiogenic properties of endothelial progenitor cells in vitro. *Blood*, 2007; 110: 2432-2439
- ⁹⁸ Lowry W.E., Blanpain C., Nowak J.A., Guasch G., Lewis L., Fuchs E., Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells. *Genes Dev.* 2005;19: 1596-1611
- ⁹⁹ Fahiminiya S., Majewski J., Mort J., Moffatt P., Glorieux F.H., Rauch F., Mutations in WNT1 are a cause of osteogenesis imperfecta. *J Med Genet.* 2013; 50:345-348
- ¹⁰⁰ Chen A.E., Ginty D.D., Fan C.M., Protein kinase A signalling via CREB controls myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature.* 2005; 433:317-322

-
- ¹⁰¹ Kanazawa A., Tsukada S., Sekine A., Tsunoda T., Takahashi A., Kashiwagi A., Tanaka Y., Babazono T., Matsuda M., Kaku K., Iwamoto Y., Kawamori R., Kikkawa R., Nakamura Y., Maeda S., Association of the gene encoding wntless-type mammary tumor virus integration-site family member 5B (WNT5B) with type 2 diabetes. *Am J Hum Genet.* 2004;75: 832-843
- ¹⁰² Habas R., Dawid I.B., Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *J Biol.* 2005;4:2.
- ¹⁰³ Minde D.P., Anvarian Z., Rüdiger S.G., Maurice M.M., Messing up disorder: how do missense mutations in the tumor suppressor protein APC lead to cancer? *Mol Cancer* 2011;10: 101
- ¹⁰⁴ Durak-Kozica M., Paszek E., Stępień E., Role of the Wnt signalling pathway in the development of endothelial disorders in response to hyperglycaemia. *Expert Rev Mol Med.*, 2019; 7:1-12
- ¹⁰⁵ Chandramouli A., Hatsell S.J., Pinderhughes A., Koetz L., Cowin P., Gli activity is critical at multiple stages of embryonic mammary and nipple development. *PLoS One.*2013; 8: 79845
- ¹⁰⁶ Haidari M., Zhang W., Willerson J.T., Dixon R.A., Disruption of endothelial adherens junctions by high glucose is mediated by protein kinase C- β -dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation. *Cardiovasc Diabetol.*2014;13: 105
- ¹⁰⁷ Holnthoner W., Pillinger M., Groger M., Wolff K., Ashton A.W., Albanese C., Neumeister P., Pestell R.G., Petzelbauer P., Fibroblast growth factor-2 induces Lef/Tcf-dependent transcription in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 2002;277: 45847-45853
- ¹⁰⁸ Gelfand B.D., Meller J., Pryor A.W., Kahn M., Bortz P.D., Wamhoff B.R., Blackman B.R., Hemodynamic activation of beta-catenin and T-cellspecific transcription factor signaling in vascular endothelium regulates fibronectin expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31: 1625-1633
- ¹⁰⁹ Hou N., Ye B., Li X., Margulies K.B., Xu H., Wang X., Li F., Transcription Factor 7-like 2 mediates canonical Wnt/ β -Catenin Signaling and c-myc upregulation in heart failure. *Circ Heart Fail.* 2016;9:1-18
- ¹¹⁰ Cesare A.J., Reddel R.R., Alternative lengthening of telomeres. Models, mechanisms , and implications. *Nat Rev Genet.* 2010;11: 319-330

-
- ¹¹¹ Livshits M.A., Khomyakova E., Evtushenko E.G., Lazarev V.N., Kulemin N.A., Semina S.E., Generozov E.V., Govorun V.M., Isolation of exosomes by differential centrifugation: Theoretical analysis of a commonly used protocol. *Scientific Reports.*, 2015; 5:17319
- ¹¹² Cleaves H.J. 2015 Svedberg Unit. In: Gargaud M. et al. (eds) *Encyclopedia of Astrobiology*. Springer, Berlin, Heidelberg
- ¹¹³ Johansen A.M., Monte Carlo Methods. *International Encyclopedia of Education (Third Edition)*, 2010: 296-303
- ¹¹⁴ Guo C., Levine H., Statistical A., Mechanics Model for Receptor Clustering, *J Biol Phys*, 2000; 26:219-234
- ¹¹⁵ Metropolis N., Ulam S., The Monte Carlo Method., *JOURNAL OF THE AMERICAN STATISTICAL ASSOCIATION.*, 1949; 44: 335-341
- ¹¹⁶ Blundell E.L.C.J., Mayne L.J., Billinge E.R., Platt M., Emergence of tunable resistive pulse sensing as a Biosensor, *Anal. Methods*, 2015; 7: 7055
- ¹¹⁷ Vogel R., Anderson W., Eldridge J., Glossop B., Willmott G.,. A Variable Pressure Method for Characterizing Nanoparticle Surface Charge Using Pore Sensors. *Anal. Chem.*2012; 84:3125-3131
- ¹¹⁸ van der Pol E., Hoekstra A.G., Sturk A., Otto C., van Leeuwen T.G., Nieuwland R., Optical and non-optical methods for detection and characterization of microparticles and exosomes. *J Thromb Haems.* 2010;8:2596–2607
- ¹¹⁹ Lacroix R., Robert S., Poncelet P., Kasthuri R.S., Key N.S., Dignat-George F., Standardization of platelet-derived microparticle enumeration by flow cytometry with calibrated beads: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *J Thromb Haems.* 2010; 8:2571–2574
- ¹²⁰ Kibria G., Ramos E.K., Lee K.E., Bedoyan S., Huang S., Samaeekia R., Athman J.J., Harding C.V., Lötvall J., Harris L., Thompson C.L., Liu H., A rapid, automated surface protein profiling of single circulating exosomes in human blood, *Scientific Reports* 2016; 6:36502
- ¹²¹ Durak-Kozica M., Baster Z., Kubat K., Stępień E., 3D visualization of extracellular vesicle uptake by endothelial cells. *Cellular & Molecular Biology Letters.* 2018; 23:57
- ¹²² IZON SCIENCE LIMITED. Tunable Resistive Pulse Sensing: Essential information about nanoparticles is revealed quickly and accurately. www.izon.com.

-
- ¹²³ Thery C, Ostrowski M, Segura E., Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9: 581–593
- ¹²⁴ 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; 3:3
- ¹²⁵ Witwer K.W., Buzas E.I., Bemis L.T., Bora A., Lasser C., Lotvall J., Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles.* 2013; 2:1-25
- ¹²⁶ Jeppesen D.K., Hvam M.L., Primdahl-Bengtson B., Boysen A.T., Whitehead B., Dyrskjot L., Orntoft T.F., Howard K.A., Ostensfeld M.S., Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation. *J Extracell vesicles* 2014; 3:25011
- ¹²⁷ Dragovic R.A., Gardiner C., Brooks A.S., Tannetta D.S., Ferguson D.J., Hole P., Dragovic R, Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine.* 2011; 7: 780–788
- ¹²⁸ Gardiner C., Ferreira Y.J., Dragovic R.A., Redman C.W., Sargent I.L., Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. *J Extracell Vesicles.* 2013; 2 19671
- ¹²⁹ 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: 796–810
- ¹³⁰ Maas S.L., De Vrij J., Broekman M.L., Quantification and Size-profiling of Extracellular Vesicles Using Tunable Resistive Pulse Sensing. *J Vis Exp.*, 2014; 92:51623
- ¹³¹ van der Pol E., Coumans F., Varga Z., Krumrey M., Nieuwland R, Innovation in detection of microparticles and exosomes. *International Society on Thrombosis and Haemostasis*, 2013; 1:36-45
- ¹³² Martins T.S., Catita J., Martins Rosa I., AB da Cruz E., Silva O., Henriques A.G., Exosome isolation from distinct biofluids using precipitation and column-based approaches. *PLOS ONE.*, 2018; 13: 0198820
- ¹³³ Rautou P.E., Mackman N., Microvesicles as risk markers for venous thrombosis. *Expert Rev Hematol* 2013; 6:91-101
- ¹³⁴ Tissot J.D., Canellini G., Rubin O., Angelillo-Scherrer A., Delobel J., Prudent M., Lion N., Blood microvesicles: From proteomics to physiology. *Translat Proteom* 2013; 1:38-52

-
- ¹³⁵ Nguyena D.B., Ly T.B., Wesseling M.C., Hittinger M., Torge A., Devitt A., Perrie Y., Bernhardt I., Characterization of Microvesicles Released from Human Red Blood Cells, *Cell Physiol Biochem* 2016;38:1085-1099
- ¹³⁶ Zhmurov A., Brown A.E.X., Litvinov R.I., Dima R.I., Weisel J.W., Barsegov V., Mechanism of Fibrin(ogen) Forced Unfolding. *Structure*. 2011; 19: 1615–1624
- ¹³⁷ Gao J., Wang S., Wang Z., Yield H., Scalable and Remotely Drug-Loaded Neutrophil-derived Extracellular Vesicles (EVs) for Anti-inflammation Therapy, *Biomaterials*. 2017; 135: 62–73
- ¹³⁸ Durrieu L., Bharadwaj A., Waisman D.M., Analysis of the thrombotic and fibrinolytic activities of tumor cell–derived extracellular vesicles, *Blood advances*, 2018; 2:1054-1065
- ¹³⁹ Patel G.K., Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *Scientific Reports*, 2019; 9:5335
- ¹⁴⁰ Garcia-Contreras M., Shah S.H., Tamayo A., Robbins P.D., Golberg R.B., Mendez A.J., Ricordi C., Plasma-derived exosome characterization reveals a distinct microRNA signature in long duration Type 1 diabetes. *Scientific Reports*, 2017;7: 5998
- ¹⁴¹ Stępień E, Durak-Kozica M., Kamińska A., Targosz-Korecka M., Libera M., Tylko G., Opalińska A., Kapusta M., Solnica B., Georgescu A., Costa M.C., Czyżewska-Buczyńska A., Witkiewicz W., Małecki M.T., Enguita F.J., Circulating ectosomes: Determination of angiogenic microRNAs in type 2 diabetes., *Theranostics*. 2018;8:3874-3890
- ¹⁴² Rice G.E., Scholz-Romero K., Sweeney E., Peiris H., Kobayashi M., Duncombe G., Mitchell M.D., Salomon C., The Effect of Glucose on the Release and Bioactivity of exosomes From First Trimester Trophoblast Cells, *J Clin Endocrinol Metab.*, 2015;100: 1280–1288
- ¹⁴³ Chen Q., Takada R., Noda C., Kobayashi S., Takada S. Different populations of Wnt-containing vesicles are individually released from polarized epithelial cells. *Sci Rep*. 2016;6:35562
- ¹⁴⁴ Bussche L., Rauner G., Antonyak M., Syracuse B., McDowell M., Brown A.M., Cerione R.A., Van de Walle G.R., Microvesicle-mediated Wnt/ β -Catenin Signaling Promotes Interspecies Mammary Stem/Progenitor Cell Growth. *J Biol Chem*. 2016;291:24390-24405

-
- ¹⁴⁵ Działo E., Rudnik M., Koning R.I., Czepiel M., Tkacz K., Baj-Krzyworzeka M., Distler O., Siedlar M., Kania G., Błyszczuk P., WNT3a and WNT5a Transported by Exosomes Activate WNT Signaling Pathways in Human Cardiac Fibroblasts., *Int J Mol Sci.* 2019;20:1436
- ¹⁴⁶ Alzahrani S.H., Ajjan R.A., Coagulation and fibrinolysis in diabetes, *Diabetes & Vascular Disease Research.*, 2010;7:260–273
- ¹⁴⁷ Jöreskog G., Egberg N., Fagrell B., Fatah K., Hessel B., Johnsson H., Brismar K., Blombäck M., Altered properties of the fibrin gel structure in patients with IDDM. *Diabetologia* 1996; 39: 1519–1523
- ¹⁴⁸ Endo-Munoz L., Cai N., Cumming A., Macklin R., Merida de Long L., Topkas E., Mukhopadhyay P., Hill M., Saunders N.A., Progression of Osteosarcoma from a Non-Metastatic to a Metastatic Phenotype Is Causally Associated with Activation of an Autocrine and Paracrine uPA Axis, *PLOS ONE.*, 2015;10: 0133592
- ¹⁴⁹ Nazarenko I., Rana S., Baumann A., McAlear J., Hellwig A., Trendelenburg M., Lochnit G., Preissner K.T., Zöller M., Cell Surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced Endothelial cell activation. *Cancer Res.* 2010;70:1668–1678
- ¹⁵⁰ Deregibus M.C., Cantaluppi V., Calogero R., Lo Iacono M., Tetta C., Biancone L., Bruno S., Bussolati B., Camussi G., Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood.* 2007;110:2440–2448
- ¹⁵¹ Sáez T., Salsoso R., Leiva A., Toledo F., de Vos P., Faas M., Sobrevia L., Human umbilical vein endothelium-derived exosomes play a role in foetoplacental endothelial dysfunction in gestational diabetes mellitus. *Biochim Biophys Acta.* 2018;1864:499–508
- ¹⁵² Kim D.K., Lee J., Kim S.R., Choi D.S., Yoon Y.J., Kim J.H., Go G., Nhung D., Hong K., Jang S.C., Kim S.H., Park K.S., Kim O.Y., Park H.T., Seo J.H., Aikawa E., Baj-Krzyworzeka M., van Balkom B.W., Belting M., Blanc L., Bond V., Bongiovanni A., Borràs F.E., Buée L., Buzás E.I., Cheng L., Clayton A., Cocucci E., Dela Cruz C.S., Desiderio D.M., Di Vizio D., Ekström K., Falcon-Perez J.M., Gardiner C., Giebel B., Greening D.W., Gross J.C., Gupta D., Hendrix A., Hill A.F., Hill M.M., Nolte-'t Hoen E., Hwang D.W., Inal J., Jagannadham M.V., Jayachandran M., Jee Y.K., Jørgensen M., Kim K.P., Kim Y.K., Kislinger T., Lässer C., Lee D.S., Lee H., van Leeuwen J., Lener T., Liu M.L., Lötvall J., Marcilla A., Mathivanan S., Möller A., Morhayim J., Mullier F., Nazarenko I., Nieuwland R., Nunes D.N., Pang K., Park J., Patel T., Pocsfalvi G., Del Portillo H., Putz U., Ramirez M.I., Rodrigues M.L., Roh T.Y.,

-
- Royo F., Sahoo S., Schiffelers R., Sharma S., Siljander P., Simpson R.J., Soekmadji C., Stahl P., Stensballe A., Stępień E., Tahara H., Trummer A., Valadi H., Vella L.J., Wai S.N., Witwer K., Yáñez-Mó M., Youn H., Zeidler R., Ghossein Y.S., EVpedia: a community web portal for extracellular vesicles research. *Bioinformatics*. 2015;31:933–999
- ¹⁵³ Gajos K., Kamińska K., Awiuk K., Bajor A., Gruszczyński K., Pawlak A., Żądło A., Kowalik A., Budkowski A., Stępień E., Immobilization and detection of platelet-derived extracellular vesicles on functionalized silicon substrate: cytometric and spectrometric approach. *Anal Bioanal Chem*. 2017;409:1109–1119
- ¹⁵⁴ Montecalvo A., Larregina A.T., Shufesky W.J., Stolz D.B., Sullivan M.L., Karlsson J.M., Baty C.J., Gibson G.A., Erdos G., Wang Z., Milosevic J., Tkacheva O.A., Divito S.J., Jordan R., Lyons-Weiler J., Watkins S.C., Morelli A.E., Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*. 2012;119:756–766
- ¹⁵⁵ Kirchhausen T., Clathrin. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:699–727
- ¹⁵⁶ Wang L.H., Rothberg K.G., Anderson R.G., Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol*. 1993;123:1107–1117
- ¹⁵⁷ Doherty G.J., McMahon H.T., Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:857–902
- ¹⁵⁸ Ahram M., Sameni M., Qiu R.G., Linebaugh B., Kim D., Sloane B.F., Rac1-induced endocytosis is associated with intracellular proteolysis during migration through a three-dimensional matrix. *Exp Cell Res*. 2000;260:292–303
- ¹⁵⁹ Ridley A.J., Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol*. 2006;16:522–529
- ¹⁶⁰ Swanson J.A., Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:639–649
- ¹⁶¹ Barre' S.C., Blanc L., Bette-Bobillo P., Andre' S., Mamoun R., Gabius H.J., Vidal M., Galectin-5 is bound onto the surface of rat reticulocyte exosomes and modulates vesicle uptake by macrophages. *Blood*. 2010;115:696–705
- ¹⁶² Nanbo A., Kawanishi E., Yoshida R., Yoshiyama H., Exosomes derived from Epstein-Barr virus-infected cells are internalized via caveola-dependent endocytosis and promote phenotypic modulation in target cells. *J Virol*. 2013;87:10334–10347

-
- ¹⁶³ Menck K., Klemm F., Gross J.C., Pukrop T., Wenzel D., Binder C., Induction and transport of Wnt 5a during macrophage-induced malignant invasion is mediated by two types of extracellular vesicles. *Oncotarget*. 2013;4:2057–2066
- ¹⁶⁴ Nabi I.R., Le P.U., Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol*. 2003;161:673–677
- ¹⁶⁵ Simons K., Ehehalt R., Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest*. 2002;110:597–603
- ¹⁶⁶ Teissier E., Pécheur E.I., Lipids as modulators of membrane fusion mediated by viral fusion proteins. *Eur Biophys J*. 2007;36:887–899
- ¹⁶⁷ Christianson H.C., Svensson K.J., van Kuppevelt T.H., Li J.P., Belting M., Cancer cell exosomes depend on cell-surface heparan sulfate proteoglycans for their internalization and functional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:17380–17385
- ¹⁶⁸ Hemler M.E., Tetraspanin functions and associated microdomains. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6:801–811
- ¹⁶⁹ Zoller M., Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:40–55
- ¹⁷⁰ Levy S., Shoham T., The tetraspanin web modulates immunosignalling complexes. *Nat Rev Immunol*. 2005;5:136–148
- ¹⁷¹ Vjugina U., Evans J.P., New insights into the molecular basis of mammalian sperm-egg membrane interactions. *Front Biosci*. 2008;13:462–476
- ¹⁷² Morelli A.E., Larregina A.T., Shufesky W.J., Sullivan M.L., Stolz D.B., Papworth G.D., Zahorchak A.F., Logar A.J., Wang Z., Watkins S.C., Falo L.D. Jr, Thomson A.W., Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*. 2004;104:3257–3266
- ¹⁷³ Aplin A.E., Howe A., Alahari S.K., Juliano R.L., Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev*. 1998;50:197–263
- ¹⁷⁴ Mantel P.Y., Hjelmqvist D., Walch M., Kharoubi-Hess S., Nilsson S., Ravel D., Ribeiro M., Grüning C., Ma S., Padmanabhan P., Trachtenberg A., Ankarklev J., Brancucci N.M., Huttenhower C., Duraisingh M.T., Ghiran I., Kuo W.P., Filgueira L., Martinelli R., Marti M., Infected erythrocyte-derived extracellular vesicles alter vascular function via regulatory Ago2-miRNA complexes in malaria. *Nat Commun*. 2016; 7:12727

-
- ¹⁷⁵ Lombardo G., Dentelli P., Togliatto G., Rosso A., Gili M., Gallo S., Deregibus M.C., Camussi G., Brizzi M.F., Activated Stat5 trafficking Via Endothelial Cell-derived Extracellular Vesicles Controls IL-3 Pro-angiogenic Paracrine Action. *Sci Rep.* 2016. 6:25689
- ¹⁷⁶ Brodsky S.V., Malinowski K., Golightly M., Jesty J., Goligorsky M.S., Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promotes Formation of Endothelial Microparticles With Procoagulant Potential, *Circulation*, 2002; 106:2372-2378
- ¹⁷⁷ Mahdi F., Shariat-Madar Z., Todd R.F. 3rd, Figueroa C.D., Schmaier A.H., Expression and colocalization of cytokeratin 1 and urokinase plasminogen activator receptor on endothelial cells. *Blood*, 2001; 97:2342-2350
- ¹⁷⁸ Rao J.S., Gujrati M., Chetty C., Tumor-associated soluble uPAR-directed endothelial cell motility and tumor angiogenesis, *Oncogenesis*, 2013; 2:53
- ¹⁷⁹ Harazin A., Bocsik A., Barna L., Kincses A., Váradi J., Fenyvesi F., Tubak V., Deli M.A., Vecsernyés M., Protection of cultured brain endothelial cells from cytokine-induced damage by α -melanocyte stimulating hormone, *PeerJ*. 2018;6:4774
- ¹⁸⁰ Cho H.J., Hahn J.Y., Kim T.Y., Park K.W., Koo B.K., Shin C.S., Kim C.H., Oh B.H., Lee M.M., Park Y.B., Kim H.S., Catenin Overexpression Augments Angiogenesis and Skeletal Muscle Regeneration Through Dual Mechanism of Vascular Endothelial Growth Factor–Mediated Endothelial Cell Proliferation and Progenitor Cell Mobilization., *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:91-98
- ¹⁸¹ Viedma-Rodríguez R., Martínez-Hernández M.G., Flores-López L.A., Baiza-Gutman, L.A. Epsilon-aminocaproic acid prevents high glucose and insulin induced-invasiveness in MDA-MB-231 breast cancer cells, modulating the plasminogen activator system. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2017; 437: 65–80
- ¹⁸² Dal Monte M., Cammalleri M., Pecci V., Carmosino M., Procino G., Pini A., De Rosa M., Pavone V., Svelto M., Bagnoli P., Inhibiting the urokinase-type plasminogen activator receptor system recovers STZ-induced diabetic nephropathy, *J Cell Mol Med.* 2019; 23: 1034–1049
- ¹⁸³ Akinci B., Terzi C., Sevindik G., Yuksel F., Tunc U.A., Tunalı S., Yesil S., Hyperglycemia is associated with lower levels of urokinase-type plasminogen activator and urokinase-type plasminogen activator receptor in wound fluid, *J Diabetes Complications.* 2014; 28: 844–849

-
- ¹⁸⁴ Park S.J., Ahn E.M., Ha T.S., Shin J.I., β -catenin and its alteration in an experimental model of diabetic nephropathy. *Iran J Kidney Dis.* 2014; 8:299-309
- ¹⁸⁵ Su D., Zhao J., Hu S., Guan L., Li Q., Shi C., Ma X., Gou J., Zhou Y., GSK3 β and MCL-1 mediate cardiomyocyte apoptosis in response to high glucose. *Histochem Cell Biol.* 2019; 152:217-225
- ¹⁸⁶ <https://www.fluidic.com/resources/Toolkit/hydrodynamic-radius-Converter/>
- ¹⁸⁷ Andersson K.M., Hovmoller S., The protein content in crystals and packing coefficients in different space groups. *Acta Cryst.* 2000; 56: 789-790
- ¹⁸⁸ Quillin M.L., Matthews B.W., Accurate calculation of the density of proteins. *Acta Cryst.* 2000; 56: 791-794
- ¹⁸⁹ Erickson HP. Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biological Procedures Online*, 2009; 11: 32-51