

mgr Agata Braniewska

**Zbadanie pobierania hemoglobiny przez makrofagi
i jej przekazywania komórkom nowotworowym**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. n. med. Tomasz Rygiel

Zakład Immunologii

Wydział Lekarski

Warszawski Uniwersytet Medyczny



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2021 r.

Słowa kluczowe

hemoglobina, makrofagi, pęcherzyki zewnątrzkomórkowe

Nazwy i numery projektów badawczych, z których sfinansowano badania

Grant TEAM TECH finansowany przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej, nr FS166, pt. „Innovative cell-based, targeted drug delivery method to the tumour”. [kierownik projektu Tomasz Rygiel]

Pragnę podziękować mojemu Promotorowi dr. hab. Tomaszowi Ryglowi za opiekę podczas studiów doktoranckich, zaangażowanie, dzielenie się wiedzą i doświadczeniem oraz codzienny entuzjizm.

Dziękuję wszystkim Pracownikom Zakładu Immunologii WUM, doktorantom oraz studentom za współpracę, wartościowe rady, życzliwość i wspaniałą atmosferę pracy.

Szczególne podziękowania pragnę złożyć mgr Zuzannie Sas za nieocenioną pomoc na każdym etapie powstawiania tej pracy oraz pogodę ducha.

Mojemu Kochanemu Mężowi Piotrowi oraz Rodzinie dziękuję za motywację do realizowania wyznaczonych celów oraz codzienne wsparcie i wyrozumiałość.

Spis treści

Spis rycin	4
Spis tabel	6
Wykaz stosowanych skrótów	7
Streszczenie w języku polskim	12
Streszczenie w języku angielskim	14
1. WSTĘP	16
1.1 Makrofagi	16
1.2 Hemoglobina: budowa, funkcje i właściwości	19
1.3 Rola makrofagów w metabolizmie hemoglobiny	23
1.4 Mechanizmy transportu międzykomórkowego	24
1.4.1 Połączenia szczelinowe	24
1.4.2 Tunelujące nanorurki	25
1.4.3 Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe	29
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	35
3. MATERIAŁY I METODY	36
3.1 Hodowla komórkowa	36
3.2 Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej	37
3.3 Izolacja monocytów z jednojądrzastych komórek krwi obwodowej	38
3.4 Izolacja mysich komórek szpikowych	38
3.5 Różnicowanie komórek do makrofagów	38
3.6 Koniugacja białek z barwnikami fluorescencyjnymi	39
3.7 Modyfikacja komórek za pomocą siRNA	41
3.7.1 Elektroporacja komórek THP-1	42
3.7.2 Transfekcja komórek MDA-MB 231 za pomocą Lipofektaminy	42
3.8 Inkubacja komórek z białkami	42
3.9 Monohodowle i kohodowle komórkowe	43
3.9.1 Przygotowanie makrofagów	43
3.9.2 Przygotowanie komórek nowotworowych	43
3.9.3 Opracowanie warunków kohodowli	43
3.9.4. Medium kondycjonowane	45
3.10 Izolacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs)	45
3.10.1 Pobieranie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez komórki nowotworowe	46

3.11 Cytometria przepływowa	46
3.11 Mikroskopia konfokalna	48
3.12 Spektroskopia korelacji fluorescencji	48
3.13 Western blot	49
3.13.1 Przygotowanie próbek	49
3.13.2 Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)	50
3.13.3 Transfer białek na membranę i detekcja białek	50
3.14 Wyznaczanie poziomu ekspresji genów metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR).....	51
3.14.1 Izolacja całkowitego RNA z komórek.....	51
3.14.2 Reakcja odwrotnej transkrypcji	51
3.14.3 Reakcja PCR w czasie rzeczywistym	52
3.15 Analiza statystyczna oraz opracowanie graficzne.....	52
4. WYNIKI	54
4.1 Zbadanie pobierania Hb przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej.....	54
4.2 Zbadanie pobierania Hb przez makrofagi.	54
4.2.1 Ocena pobierania Hb przez makrofagi.	54
4.2.2 Ocena pobierania Hb przez makrofagi w czasie.	57
4.3 Zbadanie przekazywania Hb z makrofagów do komórek nowotworowych.....	58
4.3.1 Zbadanie przekazywania Hb przy użyciu spektroskopii korelacji fluorescencji	62
4.4 Zbadanie przekazywania Hb z makrofagów do makrofagów.....	63
4.5 Zbadanie pobierania BSA przez makrofagi i przekazywania BSA z makrofagów do komórek nowotworowych.....	64
4.6 Zbadanie mechanizmu przekazywania Hb z makrofagów do komórek nowotworowych.....	66
4.6.1 Zbadanie wpływu bezpośredniego kontaktu między komórkami na przekazywanie Hb	66
4.6.2 Zbadanie wpływu blokowania potencjalnego receptora dla Hb na komórkach nowotworowych na przekazywanie Hb.....	67
4.6.3 Zbadanie wpływu blokowania wewnątrzkomórkowego transportu białek na przekazywanie Hb.	68
4.6.4 Zbadanie wpływu głodzenia na przekazywanie Hb.	68
4.6.5 Zbadanie roli cytoszkieletu na przekazywanie Hb.....	69
4.6.5.1 Zbadanie wpływu hamowania polimeryzacji aktyny i polimeryzacji mikrotubul na przekazywanie Hb.	69

4.6.5.2 Zbadanie wpływu hamowania wybranych mediatorów polimeryzacji aktyny.....	70
4.6.6 Zbadanie roli TNT w przekazywaniu Hb.	71
4.6.6.1 Ocena występowania Hb w TNT między makrofagami a komórkami nowotworowymi.	71
4.6.6.2 Zbadanie wpływu mechanicznego uszkodzenia TNT na przekazywanie Hb.	72
4.6.6.3 Zbadanie wpływu wyciszenia białka M-Sec na przekazywanie Hb.	73
4.6.7 Zbadanie roli wewnątrzkomórkowych pęcherzyków w przekazywaniu Hb.	74
4.6.7.1 Ocena przekazywania pęcherzyków wewnątrzkomórkowych między makrofagami a komórkami nowotworowymi.	74
4.6.7.2 Zbadanie pobierania Hb z medium kondycjonowanego.	75
4.6.7.3 Izolacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z medium kondycjonowanego.	76
4.6.7.4 Zbadanie pobierania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez makrofagi w komórkach nowotworowych.	78
5. DYSKUSJA	80
5.1 Pobieranie Hb przez makrofagi	80
5.2 Wykorzystanie procesu przekazywania Hb w nowym systemie dostarczania leków	82
5.3 Proces przekazywania Hb z makrofagów do komórek nowotworowych	83
5.4 Mechanizm przekazywania Hb z makrofagów do komórek nowotworowych	85
5.5 Przekazywanie Hb a gospodarka żelazem	90
6. WNIOSKI	94
BIBLIOGRAFIA	95

Spis rycin

- Rycina 1. Polaryzacja makrofagów w kierunku M1 i M2.
- Rycina 2. Schematyczne przedstawienie różnorodności fenotypowej makrofagów.
- Rycina 3. Reakcje oksydacyjne Hb i ich następstwa.
- Rycina 4. Mechanizmy detoksykacyjne wolnej Hb.
- Rycina 5. Schemat połączenia szczelinowego.
- Rycina 6. Schemat tunelującej nanorurki oraz przykłady transportowanych przez nią materiałów.
- Rycina 7. Powstawanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i działanie na komórkę docelową.
- Rycina 8. Schemat reakcji fluorochromu zawierającego ester NHS z białkiem.
- Rycina 9. Schemat reakcji fluorochromu zawierającego maleimid z białkiem.
- Rycina 10. Schemat wysiewania komórek do kohodowli.
- Rycina 11. Strategia bramkowania komórek po kohodowli.
- Rycina 12. Pobieranie Hb przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej.
- Rycina 13. Pobieranie Hb przez makrofagi ocenione przy użyciu cytometrii przepływowej.
- Rycina 14. Pobieranie Hb przez makrofagi ocenione przy użyciu mikroskopii konfokalnej.
- Rycina 15. Pobieranie Hb przez monocyty i makrofagi ocenione przy użyciu techniki Western blot.
- Rycina 16. Wpływ ludzkiej surowicy na pobieranie Hb przez makrofagi.
- Rycina 17. Pobieranie Hb przez makrofagi w czasie.
- Rycina 18. Transfer Hb z makrofagów różnicowanych z linii THP-1 do komórek nowotworowych oceniony przy użyciu cytometrii przepływowej.
- Rycina 19. Transfer Hb z makrofagów różnicowanych z linii THP-1 do komórek nowotworowych oceniony przy użyciu mikroskopii konfokalnej.
- Rycina 20. Transfer Hb z ludzkich makrofagów różnicowanych z monocytów krwi, komórek RAW 264.7 oraz mysich makrofagów pochodzenia szpikowego do komórek nowotworowych oceniony przy użyciu cytometrii przepływowej.
- Rycina 21. Dynamika transferu Hb w czasie.
- Rycina 22. Transfer Hb w zależności od stężenia Hb podanej makrofagom.

Rycina 23. Rozkład średnich współczynników dyfuzji dla szybszego składnika Hb-AF568 w cytoplazmie komórek MDA-MB-231.

Rycina 24. Transfer Hb z makrofagów do makrofagów.

Rycina 25. Pobieranie BSA przez makrofagi.

Rycina 26. Transfer BSA z makrofagów do komórek nowotworowych.

Rycina 27. Wpływ gęstości komórek w kohodowli na przekazywanie Hb.

Rycina 28. Wpływ bezpośredniego kontaktu na przekazywanie Hb.

Rycina 29. Wpływ blokowania potencjalnego receptora dla Hb na komórkach nowotworowych na przekazywanie Hb.

Rycina 30. Wpływ blokowania wewnątrzkomórkowego transportu białek na przekazywanie Hb.

Rycina 31. Wpływ głodzenia komórek na przekazywanie Hb.

Rycina 32. Wpływ blokowania polimeryzacji aktyny i mikrotubul na przekazywanie Hb.

Rycina 33. Wpływ blokowania wybranych mediatorów polimeryzacji aktyny na przekazywanie Hb.

Rycina 34. Ocena występowania Hb w połączeniach komórkowych.

Rycina 35. Wpływ mechanicznego uszkodzenia TNT (wytrząsanie) na przekazywanie Hb.

Rycina 36. Ocena ilości białka M-Sec w komórkach techniką Western blot.

Rycina 37. Wpływ zmniejszenia ilości białka M-Sec na przekazywanie Hb.

Rycina 38. Ocena przekazywania pęcherzyków wewnątrzkomórkowych z makrofagów do komórek nowotworowych.

Rycina 39. Ocena pobierania Hb z medium kondycjonowanego.

Rycina 40. Charakterystyka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.

Rycina 41. Charakterystyka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych zawierających Hb.

Rycina 42. Odsetek pęcherzyków fluorescencyjnych.

Rycina 43. Pobieranie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych zawierających Hb przez komórki nowotworowe.

Spis tabel

Tabela 1. Charakterystyka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.

Tabela 2. Koniugacja białek z barwnikami fluorescencyjnymi.

Tabela 3. Związki wykorzystywane podczas kohodowli.

Tabela 4. Skład żeli poliakrylamidowych.

Tabela 5. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Tabela 6. Zbadanie ekspresji CD163 na poziomie mRNA w wybranych komórkach.

Tabela 7. Przewidywane współczynniki dyfuzji dla Hb-AF568 w temperaturze 36° C.

Wykaz stosowanych skrótów

AF	<i>Alexa Fluor</i>
AP-1	<i>activator protein-1</i> - białko aktywatorowe 1
APS	nadsiarczan amonu
Arg-1	arginaza 1
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> - Amerykańska Kolekcja Hodowli Komórkowych
ATP	<i>adenosine triphosphate</i> - adenozynotrójfosforan
BMDM	<i>bone marrow-derived macrophages</i> - mysie makrofagi pochodzenia szpikowego
BSA	<i>bovine serum albumin</i> - surowicza albumina wołowa
BVR	<i>biliverdin reductase</i> - reduktaza biliwerdyny
cAMP	cyclic adenosine monophosphate - cykliczny adenozy-3',5'-monofosforan
CD	<i>cluster of differentiation</i> - antygen różnicowania komórkowego
cDNA	<i>complementary DNA</i> - komplementarny DNA
Cp	<i>crossing point</i> - punkt przecięcia krzywej amplifikacji produktu PCR
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i> - białko wiążące element odpowiedzi na cAMP
DAMP	<i>damage-associated molecular patterns</i> - wzorce molekularne związane z uszkodzeniem
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i> - dimetylosulfotlenek
DMT1	<i>divalent metal transporter-1</i> - transporter metali dwuwartościowych
dNTP	trifosforany deoksynukleotydów
DOX	<i>doxorubicin</i> - doksorubicyna
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> - kwas edetynowy
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i> - receptor dla naskórkowego czynnika wzrostu

ESCRT	<i>endosomal sorting complex required for transport</i> - niezbędny dla transportu białkowy kompleks sortujący endosomy
EVs	<i>extracellular vesicles</i> - pęcherzyki zewnątrzkomórkowe
FasL	<i>Fas Ligand</i> - ligand dla receptora śmierci Fas
FBS	<i>fetal bovine serum</i> - płodowa surowica bydlęca
Fc	<i>crystallizable fragment</i> - fragment ulegający krystalizacji, koniec Fc przeciwciała
FCS	<i>fluorescence correlation spectroscopy</i> - spektroskopia korelacji fluorescencji
FSC	<i>forward scatter</i> - rozproszenie czołowe
GA	kwask glicyretynowy
GAPDH	<i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> - dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
GP	glikoproteina
h	<i>helper</i> - pomocniczy (dotyczy limfocytu T pomocniczego, Th)
Hb	hemoglobina
hi	<i>high</i> - wysoka
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> - ludzki wirus niedoboru odporności
HO-1	<i>heme oxygenase-1</i> - oksygenaza hemowa-1
Hp	haptoglobina
Hpr	<i>haptoglobin-related protein</i> - białko pokrewne do haptoglobiny
Hpx	<i>hemopexin</i> - hemopeksyna
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> - peroksydaza chrzanowa
HSP	<i>heat shock proteins</i> - białka szoku cieplnego
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i> - międzykomórkowa molekula adhezyjna-1
IgG	immunoglobulina klasy G
IL	interleukina
INF- γ	interferon gamma

iNOS	<i>inducible nitric oxide synthases</i> - indukowalna syntaza tlenku azotu
IP ₃	<i>inositol trisphosphate</i> - trisfosforan inozytolu
IRF	<i>interferon regulatory factor</i> - czynnik regulujący interferon
lo	<i>low</i> - niska
Mac-1	<i>macrophage-1 antigen</i> - antygen makrofagów
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i> - białko chemotaktyczne dla monocytów 1
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i> - czynnik stymulujący kolonie makrofagów
MDM	<i>monocyte-derived macrophages</i> - makrofagi izolowane z monocytów krwi obwodowej
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i> - średnia intensywność fluorescencji
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> - główny układ zgodności tkankowej
miRNA	mikro RNA
MMPs	<i>matrix metalloproteinases</i> - metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej
mRNA	<i>messenger RNA</i> - informacyjne RNA
MSCs	<i>mesenchymal stem cells</i> - mezenchymalne komórki macierzyste
mTor	<i>mechanistic target of rapamycin</i> - kinaza, której aktywność jest blokowana przez rapamycynę
MVB	<i>multivesicular body</i> - ciałka wielopęcherzykowe
MVs	<i>microvesicles</i> - mikropęcherzki
NADH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> - ester fosforanowy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego w formie utlenionej
NADPH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> - ester fosforanowy dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego w formie zredukowanej
ncRNA	<i>non-coding RNA</i> - niekodujące RNA
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> - jądrowy czynnik transkrypcyjny κB

NHS	<i>N-Hydroxysuccinimide</i> - N- hydroksysukcynimid
NK	<i>natural killer</i> - limfocyty naturalni zabójcy
NO	nitric oxide - tlenek azotu
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
oxLDL	<i>oxidized low-density lipoprotein</i> - utlenowane lipoproteiny o niskiej gęstości
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> - komórki jednojądrzaste krwi obwodowej
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> - sól fizjologiczna buforowana buforem fosforanowym pozbawiona jonów wapnia i magnezu
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> - reakcja łańcuchowa polimerazy
PE	<i>phycoerythrin</i> - fikoerytryna
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i> - kinaza fosfatydylinozytolu
PMA	<i>phorbol 12-myristate 13-acetate</i> - octanu mirystynianu forbolu
PPAR- γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i> - receptor aktywowanego przez proliferatory peroksysomów
PTX	<i>paclitaxel</i> - paklitaksel
RBP	<i>RNA-binding protein</i> - białka wiążące RNA
RFT	reaktywne formy tlenu
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i> - Rho-zależna kinaza
s	<i>soluble</i> - rozpuszczalny
SD	<i>standard deviation</i> - odchylenie standardowe
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> - dodecylosiarczan sodu
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> - elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności SDS
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> - chromatografia wykluczania
siRNA	<i>small interfering RNA</i> - małe interferencyjne RNA
SOD	<i>superoxide dismutase</i> - dysmutaza ponadtlenkowa
SSC	<i>side scatter</i> - rozproszenie boczne

STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i> - przekaźnik sygnałowy i aktywator transkrypcji
TAM	<i>tumor-associated macrophages</i> – makrofagi związane z nowotworem
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametyloetylenodiamina
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i> - transformujący czynnik wzrostu beta
TLR	<i>Toll-like receptors</i> - receptory Toll-podobne
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-alpha</i> - czynnik martwicy nowotworu alfa
TNTs	<i>tunneling nanotubes</i> - tunelujące nanorurki
UNG	<i>uracil-DNA glycosylase</i> - glikozylaza uracylowa DNA
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> - śródbłonkowy czynnik wzrostu

Streszczenie w języku polskim

Hemoglobina (Hb) to białko zawierające żelazo, które bierze udział w transporcie tlenu oraz dwutlenku węgla. Hb pełni swoją fizjologiczną funkcję wewnątrz erytrocytów, natomiast wolna Hb wykazuje właściwości prooksydacyjne i prozapalne. Z tej przyczyny, aby zapobiec negatywnym skutkom obecności wolnej Hb, w organizmie istnieje swoisty system detoksykacyjny: pozakomórkowa Hb jest wiązana przez osoczowe białko – haptoglobinę, a następnie wychwytywana przez receptor CD163 na makrofagach, gdzie Hb jest degradowana do aminokwasów, tlenku węgla, żelaza i bilirubiny. Stanowi to podstawowy sposób przetwarzania Hb w makrofagach. W badaniach naszego zespołu zaobserwowano nowy sposób procesowania Hb, który polega na transferze Hb z makrofagów do innych komórek, w tym komórek nowotworowych.

Celem niniejszej pracy była weryfikacja pobierania Hb przez makrofagi, scharakteryzowanie nieopisanego do tej pory zjawiska transferu Hb oraz zbadanie mechanizmu przekazywania Hb z makrofagów do komórek nowotworowych. Większość eksperymentów przeprowadzono na makrofagach różnicowanych z monocytarnej linii THP-1 oraz liniach nowotworowych MDA-MB 231 i SKOV3, wykorzystywano również ludzkie makrofagi różnicowane z monocytów krwi, mysie makrofagi różnicowane z komórek szpikowych oraz linię RAW264.7

Uzyskane wyniki wskazują, że spośród jednojądrzastych komórek krwi Hb była pobierana wyłącznie przez monocyty krwi. Wszystkie badane makrofagi - ludzkie oraz mysie, pierwotne komórki oraz ustalone linie komórkowe - pobierały Hb. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń sugerują, że pobieranie Hb przez makrofagi może przebiegać bez udziału haptoglobiny i receptora CD163.

Przekazywanie Hb z makrofagów do komórek nowotworowych zaobserwowano przy użyciu cytometrii przepływowej, mikroskopii konfokalnej oraz spektroskopii korelacji fluorescencji. Wszystkie badane makrofagi przekazywały Hb do komórek nowotworowych. Proces przekazywania Hb narastał w czasie. Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że przekazywanie Hb jest procesem unikatowym dla białka, ponieważ inne białko pobierane przez makrofagi – surowicza albumina bydlęca – nie było przekazywane do komórek nowotworowych. Ponadto, Hb była przekazywana między makrofagami, co świadczy o tym, że transfer Hb nie jest selektywny pod względem komórek nowotworowych.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej wykluczono zaangażowanie tunelujących nanorurek w przekazywaniu Hb. Wykazano udział mechanizmu sekcyjnego – Hb była przekazywana przez medium hodowlane. Ostatecznie udowodniono, że Hb jest wydzielana przez makrofagi w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych, które są pobierane przez komórki nowotworowe.

Wydaje się, że wydzielanie Hb przez makrofagi może być zaangażowane w proces gospodarki żelazem. Alternatywnie, uwalnianie Hb z makrofagów naładowanych tym białkiem może być mechanizmem chroniącym komórkę przed ferroptozą, czyli śmiercią zależną od żelaza. Mechanizm przekazywania Hb z makrofagów do komórek nowotworowych można wykorzystać w komórkowej terapii przeciwnowotworowej, w której lek będzie przyłączony do Hb, w takiej formie załadowany do makrofagów, a następnie podany choremu. W potencjalnej terapii makrofagi migrujące do guza nowotworowego przekażą lek skoniugowany z Hb do komórek nowotworowych.

Podsumowując, w niniejszej pracy opisano nowe zjawisko przekazywania Hb z makrofagów do komórek nowotworowych za pomocą pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Zaobserwowanie tego nieznanego do tej pory procesu skłania do kontynuowania badań nad metabolizmem Hb.

Streszczenie w języku angielskim

Investigation of Hb uptake by macrophages and its transfer to cancer cells.

Hemoglobin (Hb) belongs to the group of iron-binding proteins and is involved in the transport of oxygen and carbon dioxide. Hb performs its physiological function inside erythrocytes, whereas free Hb shows prooxidative and proinflammatory properties. Therefore, to prevent negative consequences of free Hb, a specific detoxification system exists in the body: extracellular Hb is bound by serum protein haptoglobin and taken up by CD163 receptor on macrophages, where Hb is degraded to amino acids, carbon monoxide, iron, and bilirubin. This constitutes a fundamental manner of Hb processing in macrophages. Our group has observed that Hb can be transferred from macrophages to other cells, including cancer cells.

This study aimed to verify uptake of Hb by macrophages, as well as to characterize the new phenomenon of Hb transfer and to investigate the molecular mechanism of Hb transfer. Most of the experiment was carried out using macrophages differentiated from monocytic cell line THP-1 and cancer cell lines MDA-MB 231 and SKOV3, as well as human macrophages differentiated from blood monocytes, murine macrophages differentiated from bone marrow cells and cell line RAW 264.7

Obtained results indicate that among peripheral blood mononuclear cells only monocytes took up Hb. All tested macrophages - human and murine, primary cells and cell lines – took up Hb. Results suggest that macrophages can uptake Hb independently of haptoglobin and CD163 receptor.

Transfer of Hb from macrophages to cancer cells was verified using flow cytometry, confocal microscopy, and fluorescence correlation spectroscopy. All examined macrophages were able to transfer Hb to cancer cells. Transfer of Hb grew with time. Results of experiments indicate that transfer of Hb is protein-unique since other protein – bovine serum albumin - which is taken up by macrophages, is not transferred to cancer cells. Hb transfer is not restricted to cancer cells as Hb was transferred between macrophages.

In this study we excluded the engagement of tunneling nanotubes in Hb transfer. We showed that secretion mechanism is involved in Hb transfer as Hb was transferred

through culture medium. Finally, we proofed the release of Hb by macrophages in extracellular vesicles and then its uptake by cancer cells.

Due to the presence of iron in the Hb molecule, the process of Hb secretion by macrophages can be considered as an element of iron recycling. Alternatively, the release of Hb from macrophages loaded with this protein seems to protect the cell from ferroptosis, an iron-dependent cell death. The mechanism of Hb transfer from macrophages to cancer cells can be used in cellular anti-cancer therapy, in which the drug will be linked to Hb, loaded into macrophages, and then administered to the patient. In a potential therapy, macrophages will migrate to the tumor site and will deliver the Hb-conjugated drug to the cancer cells.

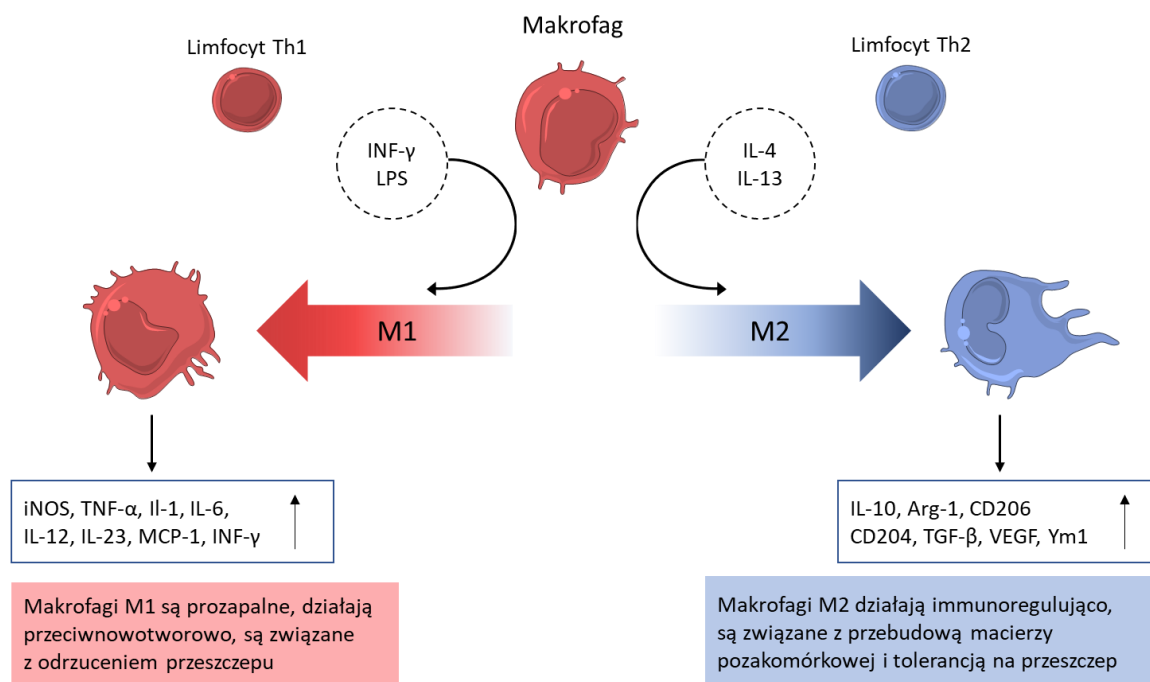
To conclude, this study describes a new phenomenon of Hb transfer from macrophages to cancer cells through extracellular vesicles. The observation of this so far unknown process prompts the continuation of research on Hb metabolism.

1. WSTĘP

1.1 Makrofagi

Makrofagi, zwane komórkami żernymi, są komórkami jednojądrzastymi, których nazwa pochodzi od ich zdolności do fagocytozy (μακρός (makrós) = duże, φαγεῖν (phagein) = jeść). Dzięki właściwościom fagocytarnym makrofagi pełnią ważne funkcje w odpowiedzi układu odpornościowego oraz homeostazie tkankowej poprzez odpowiednio zabijanie patogenów oraz usuwanie martwych komórek i ich pozostałości. Oprócz tego, makrofagi tkankowe przejawiają różnorodne narządowo-swoiste funkcje, które są indukowane i utrzymywane przez specyficzne dla tkanki czynniki środowiskowe [1][2]. Tkankowe makrofagi powstają w życiu płodowym i mają zdolność do proliferacji lub różnicują się z monocytów powstających w szpiku kostnym. Wyjątek stanowią makrofagi mózgu, które w stanach fizjologicznych nie pochodzą z monocytów z powodu istnienia bariery krwi mózgu [3].

W odpowiedzi na czynniki zewnętrzne makrofagi zmieniają profil ekspresji genów, a co za tym idzie fenotyp i właściwości, a proces ten nazywamy polaryzacją. Zmiany w polaryzacji zachodzą w sposób ciągły, co świadczy o plastyczności tych komórek. Klasyczny, umowny podział, zakłada polaryzację makrofagów w dwóch kierunkach: M1 (klasyczna) i M2 (alternatywna) (Ryc. 1). Polaryzacja w kierunku M1 zachodzi w odpowiedzi na interferon gamma (IFN- γ) oraz ligandy receptorów Toll-podobnych (TLR, ang. *Toll-like receptors*), takich jak lipopolisacharyd (LPS). Makrofagi M1 charakteryzują się zwiększoną zdolnością bakteriobójczą lub przeciwnowotworową oraz wydzielaniem dużej ilości cytokin i mediatorów prozapalnych, takich jak interleukina-1 (IL-1), IL-6, IL-12, IL-23, czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF- α , ang. *tumor necrosis factor alpha*) oraz tlenek azotu, rodniki tlenowe i enzymy proteolityczne. Klasycznie zaktywowane makrofagi uczestniczą w rozwoju odpowiedzi immunologicznej typu Th1 i Th17. Dodatkowo, makrofagi M1 zwiększają na swojej powierzchni ekspresję cząsteczek MHC klasy II oraz cząsteczek kostymulujących CD80/86, co usprawnia ich funkcję prezentacji antygenów [4][5]. Makrofagi M1 są niezbędnym elementem obrony organizmu przed zakażeniami, jednak ich aktywacja musi być ściśle regulowana, ponieważ długotrwała aktywacja może prowadzić do uszkodzenia tkanek. Makrofagi M1 są kluczowymi mediatorami w chorobach autoimmunizacyjnych, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów i nieswoiste zapalenie jelit [6].



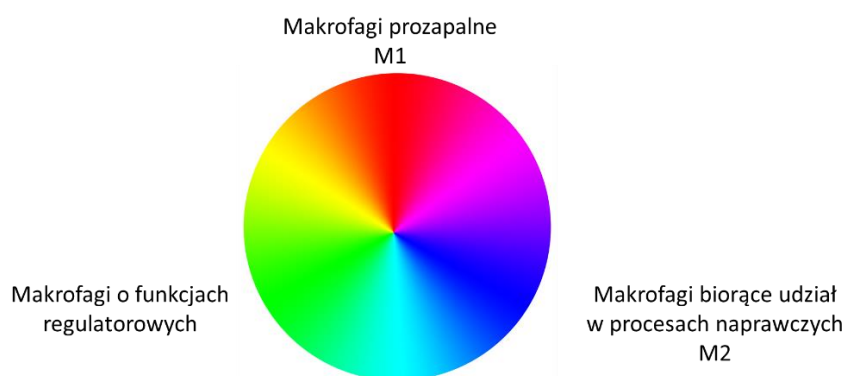
Rycina 1. Polaryzacja makrofagów w kierunku M1 i M2. Na podstawie [7]. Opis w tekście.

Makrofagi M2, aktywowane alternatywnie, mają właściwości przeciwzapalne i kontrolują procesy naprawcze tkanek. Ich polaryzacja jest wynikiem stymulacji IL-4 i IL-13. Biorą udział w procesach regeneracyjnych, włóknieniu, miażdżycy, angiogenezie oraz odpowiedzi typu Th2, w tym przeciw pasożytniczej [8][5]. Makrofagi M2 wydzielają znaczne ilości cytokin immunosupresyjnych, takich jak IL-10 i transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-β, ang. *transforming growth factor beta*). Ważnymi markerami makrofagów M2 są: arginaza 1 (Arg-1), IL-4R (receptor dla IL-4), cząsteczka CD206 (receptor mannozowy), białko Retna (Fizz1) oraz eozynofilowe białka z rodziny chitynaz (Ym1, Ym2) [4][9]. Dodatkowo, wśród makrofagów M2, wyróżnia się 3 podgrupy: M2a, M2b i M2c. Polaryzacja M2a jest stymulowana przez IL-4, IL-13 lub podczas infekcji grzybiczych oraz pasożytniczych i jest związana z odpowiedzią immunologiczną typu Th2. Makrofagi M2b są aktywowane przez kompleksy immunologiczne oraz ligandy TLR lub IL-1. Makrofagi M2b produkują zwiększoną ilość IL-10, natomiast zmniejszają produkcję IL-12, a także zwiększają ekspresję cząsteczek zaangażowanych w prezentację antygenów (MHC klasy II, CD80/86). Makrofagi M2c różnicują się pod wpływem IL-10 oraz TGF-β i przyczyniają się do przebudowy tkanek i wytwarzania macierzy zewnątrzkomórkowej [10].

W polaryzację makrofagów zaangażowanych jest wiele czynników transkrypcyjnych. Makrofagi M1 wykazują ekspresję czynników transkrypcyjnych, takich

jak NF- κ B (ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), AP-1 (ang. *activator protein-1*), przekaźnik sygnałowy i aktywator transkrypcji STAT1 (ang. *signal transducer and activator of transcription*) oraz czynnik regulujący interferon IRF-5 (ang. *interferon regulatory factor*). Makrofagi M2 wykazują ekspresję STAT6, IRF-4, receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów PPAR- γ (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*) i białko wiążące element odpowiedzi na cAMP, CREB (ang. *cAMP response element-binding protein*). Te czynniki transkrypcyjne wzajemnie na siebie oddziałują i regulują aktywację makrofagów w kierunku określonego fenotypu. Kooperacja między nimi ma kluczowe znaczenie w pro- lub przeciwzapalnych funkcjach makrofagów, a utrata stanu równowagi może być szkodliwa dla organizmu [7].

Za pomocą innego podziału, biorącego pod uwagę funkcje, wyróżnia się: makrofagi biorące udział w obronie organizmu (prozapalne), makrofagi biorące udział w procesach naprawczych oraz makrofagi o funkcjach regulatorowych (Ryc. 2) [11]. Podział ten można zobrazować za pomocą barwnego koła i przenikających się barw, co dobrze ilustruje płynne zmiany w fenotypie makrofagów, a także istnienie makrofagów o cechach pośrednich. Przykładem takich makrofagów są makrofagi towarzyszące nowotworom (ang. *tumor associated macrophages*, TAM). Są to komórki stanowiące jeden z głównych komponentów guzów nowotworowych. W większości wypadków duży naciek makrofagów sprzyja rozwojowi nowotworu poprzez promowanie angiogenezy oraz regulację procesów immunologicznych, w tym rekrutację i aktywację limfocytów [12].



Rycina 2. Schematyczne przedstawienie różnorodności fenotypowej makrofagów. Na podstawie [11]. Kolorem czerwonym oznaczono makrofagi prozapalne, kolorem niebieskim makrofagi biorące udział w procesach naprawczych, a kolorem zielonym makrofagi o funkcjach regulatorowych. Kolor błękitny może reprezentować makrofagi towarzyszące nowotworom (TAM), które mają wiele cech makrofagów regulatorowych, ale mają również pewne cechy makrofagów M2. Innym przykładem są makrofagi M2 u osób otyłych, które mogą przechodzić w kierunku klasycznego fenotypu aktywowanych makrofagów (kolor różowy).

1.2 Hemoglobina: budowa, funkcje i właściwości

Hemoglobina (Hb) to główne białko występujące w erytrocytach. Podstawową funkcją Hb w erytrocytach jest wiązanie i transport tlenu z płuc do tkanek oraz dwutlenku węgla z tkanek do płuc. Strukturalnie, Hb jest tetramerem zbudowanym z dwóch par podjednostek. Podjednostki Hb nazywane są literami greckiego alfabetu (np. α , β , γ , δ). Prawidłowa Hb dorosłych to w większości HbA ($\alpha_2\beta_2$). Dodatkowo, we krwi dorosłych występuje do 2,5% HbA2 ($\alpha_2\delta_2$) oraz do 2% płodowej HbF ($\alpha_2\gamma_2$). Każda podjednostka Hb jest zbudowana z łańcucha białkowego (globiny) oraz grupy prostetycznej - hemu, zawierającej żelazo (Fe) [13][14]. U ludzi, geny kodujące α -globinę i β -globinę są zlokalizowane odpowiednio na chromosomie 16 i 11. Do tej pory odkryto ponad 1000 wariantów ludzkiej hemoglobiny wynikających głównie z mutacji punktowych w genach globin, które zmieniają strukturę i właściwości biochemiczne hemoglobiny, a efekty fizjologiczne tych wariantów wahają się od nieznacznego do ciężkiego [15]. Łańcuch globiny zbudowany jest z 7-8 α -helis, nazwanych A-H, które tworzą strukturę globularną. Hem jest położony między dwiema histydynami: E7 i F8, z których F8 (tzw. histydyna proksymalna) wiąże się z atomem żelaza [16]. Hem składa się z części organicznej, protoporfiryny, oraz atomu żelaza wiążącego tlen. Protoporfiryna jest zbudowana z czterech pierścieni pirolowych tworzących pierścień tetrapiolowy, do którego przyłączone są łańcuchy boczne (metylowe, winylowe i kwasu propionowego) [17]. Tylko Hb zawierająca zredukowaną formę żelaza (Fe^{2+}) może związać atom tlenu. [15].

Powstawanie Hb rozpoczyna się w prekursorach erytrocytów w szpiku kostnym i jest kontynuowane do etapu retikulocytów występujących we krwi. Synteza hemu składa się z ośmiu reakcji enzymatycznych, z których połowa zachodzi w mitochondriach, a połowa w cytozolu. Ostatni etap stanowi inkorporacja żelaza mająca miejsce w mitochondriach, po czym hem jest transportowany do cytozolu. Każda cząsteczka hemu łączy się niekowalencyjnie z globiną syntetyzowaną przez rybosomy, tworząc podjednostkę zwaną łańcuchem Hb. Cztery łańcuchy budują tetramer Hb [18][19][20].

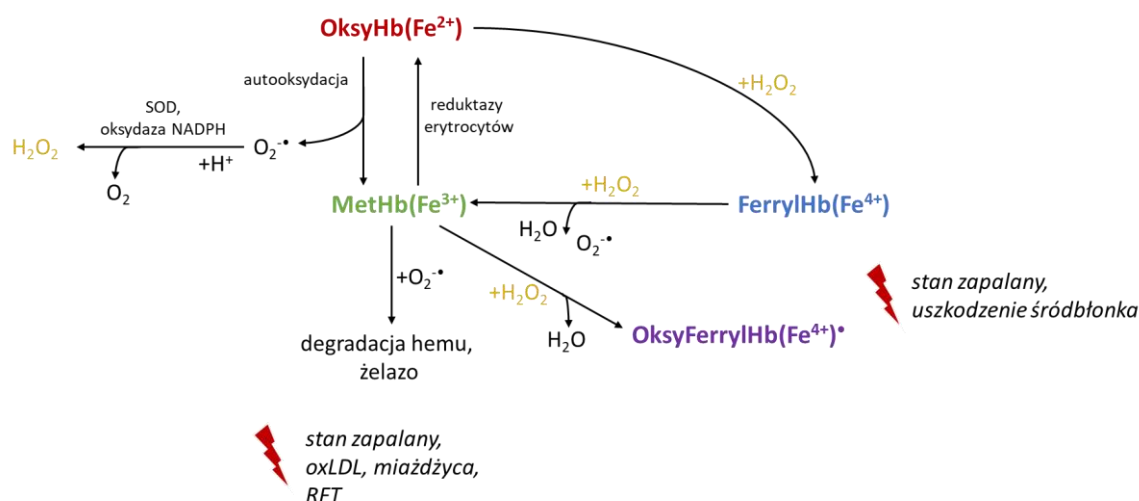
Hb występuje w dwóch formach: T (ang. *tense*-napięta) oraz R (ang. *relaxed*-rozluźniona). Hb niezwiązana z tlenem, deoksyhemoglobina, jest w formie T. Gdy jedna cząsteczka tlenu wiąże się z jedną podjednostką Hb, dochodzi do zmian konformacyjnych: atom żelaza wsuwa się w płaszczyznę hemu, pociągając za sobą histydynę proksymalną. Dochodzi do zerwania wiązań jonowych między podjednostkami, struktura zaczyna się

rozluźniać, co później ułatwia cząsteczkom tlenu związaną się z jednym z pozostałych niezajętych miejsc. Hb, w której wszystkie cztery miejsca są zajęte tlenem jest w formie R i jest nazywana oksyhemoglobina. Po odłączeniu cząsteczki tlenu, struktura hemoglobiny ulega nieznacznym zmianom, aby ułatwić uwalnianie kolejnych cząsteczek tlenu. Ta właściwość hemoglobiny, dzięki której jest ona w stanie nieznacznie zmieniać swoją strukturę w celu promowania wiązania i uwalniania tlenu, znana jest jako kooperatywność. Ta właściwość sprawia, że Hb jest idealną cząsteczką do transportu tlenu [13][17].

Uwolnieniu O_2 w tkankach towarzyszy wiązanie CO_2 . CO_2 przyłącza się do końcowych grup aminowych globiny tworząc wiązania karbaminianowe. Hb odpowiada za transport około 15% CO_2 , pozostała część jest transportowana jako kwas węglowy lub rozpuszczona w osoczu [17][16]. Do gazów transportowanych przez Hb należą również NO i CO, które pełnią funkcję cząsteczek sygnałowych [21]. Oprócz transportu gazów oddechowych, Hb bierze udział w regulacji równowagi kwasowo-zasadowej poprzez wiązanie kationu wodorowego (H^+) [14].

Obok cech umożliwiających skuteczny transport tlenu, Hb posiada właściwości, które czynią ją cząsteczką niebezpieczną dla komórek i tkanek organizmu. Oksyhemoglobina (Fe^{2+}) może ulec autooksydacji do methemoglobiny (Fe^{3+}) (Ryc. 3), która nie może związać tlenu. Mimo tego, że oksyhemoglobina jest stabilna, to około 3% Hb ulega spontanicznej autooksydacji, co jest przyspieszone w warunkach niedotlenienia [22]. Mechanizmem zabezpieczającym przed nadmierną autooksydacją są enzymy redukujące obecne w erytrocytach: reduktaza NADH cytochromu b5 oraz reduktaza methemoglobiny [23]. Po wysyceniu mechanizmów antyoksydacyjnych wewnątrz erytrocytu, a także podczas hemolizy, Hb ulega kolejnym reakcjom oksydacyjnym. Methemoglobina reaguje z nadtlenkiem wodoru (H_2O_2), powstałym głównie pod wpływem tkankowej oksydazy NADPH lub dysmutazy ponadtlenkowej (ang. *superoxide dismutase*, SOD). W kaskadzie kilku reakcji powstają: ferrylohemoglobina [FerryloHb(Fe^{4+})], methemoglobina [MetHb(Fe^{3+})], oksyferrylohemoglobina [OksyferryloHb(Fe^{4+})] (Ryc. 3). [24][25][26]. Następnie dochodzi do rozpadu Hb, uwolnienia hemu i precypitacji globiny [27]. Natomiast, wolne żelazo może brać udział w reakcji Fentona, czego następstwem jest generowanie rodnika hydroksylowego ($HO^{\bullet}$). Podczas hemolizy, produkty oksydacji i rozpadu Hb, w tym reaktywne formy tlenu (RFT), są szczególnie groźne, ponieważ znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie śródbłoka naczyniowego, a także przechodzą do tkanek, gdzie bezpośrednio oddziałują na białka i lipidy [21]. Utlenione formy Hb

uszkadzają śródbłonek naczyń i wywołują reakcję zapalną [28]. Hem Fe^{3+} (hematyna), który łatwo oddysocjowuje od białka, jest wysoce lipofilny, inkorporuje w błony komórek oraz lipoproteiny [22][29]. Hematyna jest cząsteczką indukującą stan zapalny, przyczynia się do zmian miażdżycowych (poprzez utlenianie LDL) [30][31] oraz uszkodzenia nerek [32]. Dodatkowo, w przestrzeni naczyniowej, wolna Hb wiąże tlenek azotu (NO), ograniczając jego biodostępność jako cząsteczki sygnałowej, modulującej napięcie naczyniowe, hamującej agregację płytek i ekspresję molekuł adhezyjnych, co w rezultacie upośledza czynność naczyń [21]. Prooksydacyjne, prozapalne i cytotoksyczne działanie wolnej hemoglobiny, hemu i Fe są odpowiedzialne za szereg niekorzystnych objawów klinicznych, w tym zaburzenia żołądkowo-jelitowe, sercowo-naczyniowe, płucne, moczowo-płciowe, nerkowe i hematologiczne [33][34].

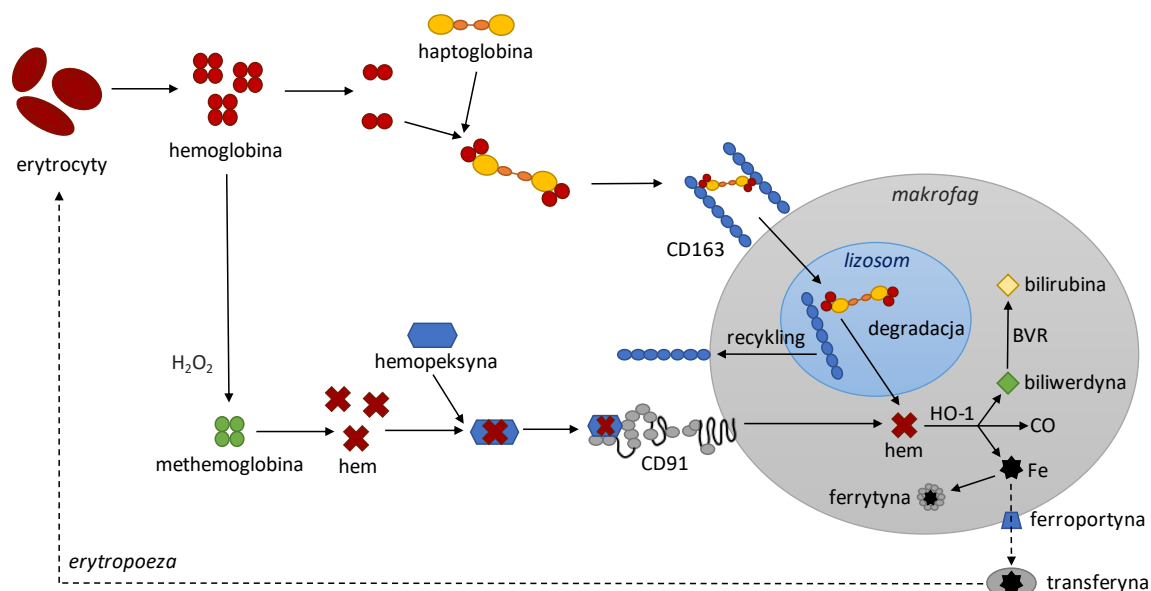


Rycina 3. Reakcje oksydacyjne Hb i ich następstwa. Objasnienie w tekście. RTF-reaktywne formy tlenu, oxLDL-utlenowane lipoproteiny o niskiej gęstości (ang. *oxidized low-density lipoprotein*), SOD- dysmutaza ponadtlenkowa (ang. *superoxide dismutase*), ferrylHb(Fe^{4+})-ferrylohemoglobina, metHb(Fe^{3+})-methemoglobina, oksyferryloHb(Fe^{4+})-oksyferrylohemoglobina, $\text{HO}^\bullet$ -rodnik hydroksylowy, $\text{O}_2^{\bullet-}$ -anionorodnik ponadtlenkowy, H_2O_2 -nadtlenek wodoru.

W związku z licznymi negatywnymi skutkami obecności wolnej Hb, istnieje szereg mechanizmów neutralizujących tą postać Hb (Ryc. 4). Kluczowymi cząsteczkami w procesie usuwania Hb uwolnionej z erytrocytów są haptoglobina (Hp) oraz receptor CD163. Haptoglobina jest białkiem osocza o wysokim powinowactwie do Hb, które wiąże nieodwracalnie Hb, co blokuje jej właściwości utleniające, uniemożliwia penetrację do tkanek, w tym filtrację nerkową [35][36][37][38]. Kompleks Hp-Hb krąży w osoczu do czasu związania z receptorem CD163 obecnym na monocytach/makrofagach, gdzie podlega degradacji [39][40]. Cząsteczki globiny ulegają proteolitycznej degradacji przez

lizosomalne enzymy proteolityczne (np. katepsyna D) lub enzymy cytozolowe (glioksalaza I) do aminokwasów [41]. Uwolniony hem indukuje ekspresję szeregu genów, w tym enzymu oksygenazy hemowej-1 (ang. *heme oxygenase-1*, HO-1), która rozkłada hem do żelaza, CO oraz biliwerdyny (ang. *biliverdin reductase*, BVR). Biliwerdyna jest metabolizowana do bilirubiny przez reduktazę biliwerdyny. Żelazo jest magazynowane w ferrytynie lub eksportowane poza makrofag przez ferroportynę-1 [42][43][44][45].

Opisano także inne białko osocza, białko pokrewne do haptoglobiny (ang. *haptoglobin-related protein*, Hpr), które wiąże Hb, ale nie powoduje wiązania z receptorem CD163 [46]. W sytuacji wysycenia Hp, kiedy dochodzi do utlenienia Hb i uwolnienia hemu, drugą linię obrony stanowi białko hemopeksyna (ang. *hemopexin*, Hpx), wiążąca wolny hem. Powstały kompleks jest endocytowany przez receptor CD91 występujący na różnych komórkach, w tym makrofagach, hepatocytach i neuronach [47].



Rycina 4. Mechanizmy detoksykacyjne wolnej Hb. Na podstawie [48]. Podczas hemolizy i uszkodzenia tkanek, Hb może być uwolniona z erytrocytów do osocza i przestrzeni pozakomórkowej. Wolna Hb wiąże się z haptoglobiną (Hp), po czym kompleks Hb-Hp jest endocytowany przez receptor CD163 obecny na makrofagach. W lizosomach makrofagów Hb podlega degradacji do aminokwasów i hemu, natomiast receptor CD163 ulega recyklingowi do błony plazmatycznej. Hem jest metabolizowany do biliwerdyny, CO i Fe przez oksygenazę hemową-1 (HO-1). Reduktaza biliwerdyny (BVR) konwertuje biliwerdynę do bilirubiny. Fe jest magazynowane w ferrytynie lub eksportowane, a następnie transportowane przez transferynę i wykorzystywane w erytropoezie. Dodatkowy mechanizm detoksykacyjny stanowi hemopeksyna (Hpx), która wiąże hem uwolniony z methemoglobiną, a następnie kompleks Hpx-hem podlega endocytozie przez receptor CD91.

1.3 Rola makrofagów w metabolizmie hemoglobiny

Makrofagi pełnią istotną rolę zarówno w syntezie, jak i rozkładzie Hb, poprzez udział w powstawaniu i usuwaniu erytrocytów oraz metabolizmie żelaza. Makrofagi szpiku kostnego są źródłem sygnałów do proliferacji i różnicowania dla prekursorów erytrocytów oraz źródłem żelaza niezbędnego do syntezy Hb [49][45][50]. Co ważne, większość żelaza (90%) do syntezy Hb pochodzi z recyklingu żelaza mającego początek w makrofagach metabolizujących Hb [51].

W prawidłowych warunkach, około 10% całkowitej hemoglobiny jest usuwana za pomocą Hp/CD163, a około 90% w procesie erytrofagocytozy (Greer et al., 2018). Erytrofagocytoza to proces pobierania i rozkładu starzejących się erytrocytów, zachodzący w makrofagach, głównie w śledzionie, wątrobie i szpiku kostnym, przy czym udział poszczególnych organów w tym procesie nie jest do końca określony [52][45]. W przebiegu erytrofagocytozy, fagosom zawierający erytrocyt łączy się z lizosomem, tworząc erytrofagolizosom, w którym erytrocyt ulega degradacji [45]. Oszacowano, że 1 makrofag jest w stanie rozłożyć 1 erytrocyt/dzień bez negatywnych skutków, natomiast zwiększona erytrofagocytoza może być niekorzystna dla makrofagów [53]. Nasiloną erytrofagocytoza powoduje zależną od żelaza śmierć makrofagów śledziony (ferroptozę), co jest kompensowane proliferacją makrofagów rezydujących oraz rekrutacją monocytów [54]. Wolna Hb pojawiająca się we krwi, jest katabolizowana głównie w wątrobie, w umiarkowanym stopniu w szpiku kostnym, a także w małym stopniu w śledzionie [55].

Cząsteczką błonową makrofagów biorącą udział w metabolizmie Hb jest CD163. CD163 jest błonowym receptorem należącym do grupy receptorów zmiatających (ang. *scavenger receptor*) występującym na monocytach i tkankowych makrofagach [56][57]. Ekspresja CD163 wzrasta podczas różnicowania monocytów do makrofagów [58]. Dodatkowo, ekspresja CD163 jest stymulowana czynnikami prozapalnymi, takimi jak interleukina-6 (IL-6) oraz przeciwzapalnymi, jak glikokortykoidy i IL-10 [59][60]. Cząsteczka CD163 odpowiada za wiązanie kompleksu Hb-Hp [39]. Związanie Hb przez Hp zwiększa powinowactwo Hb do CD163 [61]. Wolna Hb jest również wiązana przez CD163 z mniejszym powinowactwem do tego receptora [62]. Dane literaturowe wskazują, że brak Hp u myszy powoduje nasilenie negatywnych skutków hemolizy [63]. Z drugiej strony, u myszy związanie Hb przez Hp nie powoduje zwiększonego

powinowactwa do CD163, który w tym układzie odpowiada tylko częściowo za usuwanie Hb [64]. Przykładem niekonwencjonalnego sposobu utylizacji Hb u myszy jest endocytoza kompleksu Hb z rozpuszczalną formą CD163 (sCD163) oraz immunoglobulinami klasy G (sCD163-Hb-IgG) za pośrednictwem receptora Fcγ przez monocyty/makrofagi, a także komórki śródbłónka [65].

Szczególnie ważną populacją komórek w metabolizmie Hb są makrofagi miazgi czerwonej śledziony, o fenotypie F4/80^{hi}CD68⁺CD11b^{lo/-}, których różnicowanie zachodzi pod wpływem czynnika transkrypcyjnego Spi-C. Komórki te charakteryzują się wysoką ekspresją genów kodujących cząsteczki biorące udział w metabolizmie Hb: CD163, oksygenazy hemowej, ferroportyny [66].

Rolę makrofagów w metabolizmie Hb podkreślają obserwacje kliniczne toksycznego przebiegu epizodów hemolizy wewnątrznaczyniowej u pacjentów pediatrycznych z ostrą białaczką szpikową, leczonych lekiem cytotoksycznym skoniugowanym z przeciwciałem anti-CD33 (gemtuzumabem ozogamycyny). Lek ten, oprócz zabijania komórek białaczkowych, działa cytotoksycznie również na makrofagi wątroby, śledziony i szpiku kostnego, które mają na swojej powierzchni zarówno receptor CD33, jak i CD163. Zastosowanie tej terapii powoduje ograniczenie mechanizmów detoksykacyjnych Hb, o czym świadczy podwyższony poziom Hb, Hp oraz zmniejszany poziom bilirubiny we krwi [67].

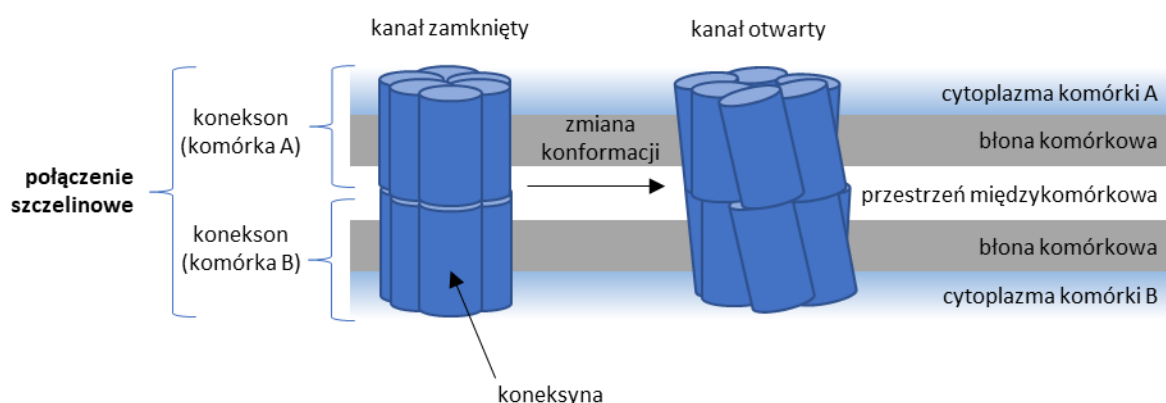
1.4 Mechanizmy transportu międzykomórkowego

Komunikacja międzykomórkowa jest istotną cechą organizmów wielokomórkowych. Do niedawna uważano, że komunikacja pomiędzy komórkami zachodzi wyłącznie poprzez cytokiny, chemokiny, hormony, czynniki wzrostu, a także transfer sygnałów poprzez międzykomórkowe połączenia szczelinowe. W ciągu ostatnich dwóch dekad odkryto nowe struktury takie jak pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (egzosomy, mikropęcherzyki) i tunelujące nanorurki, co znacznie poszerzyło wiedzę na temat mechanizmów komunikacji międzykomórkowej.

1.4.1 Połączenia szczelinowe

Połączenia szczelinowe (ang. *gap junctions*) są wąskimi kanałami łączącymi elektrycznie i metabolicznie sąsiadujące komórki. Pozwalają one na wymię małych cząsteczek o masie do 1 kDa, takich jak Ca²⁺, K⁺, cAMP, ATP, IP₃, glukoza i kwas glutaminowy [68][69][70].

Połączenia szczelinowe są zbudowane z koneksyn, białek zawierających dwie zewnątrzkomórkowe domeny (E1 i E2), cztery hydrofobowe domeny błonowe (M1-M4) oraz trzy domeny cytoplazmatyczne, w tym koniec aminowy i karboksylowy. Koneksyny tworzą heksagonalny pierścień (konekson) (Ryc. 5). Dwa koneksyny pochodzące od sąsiadujących komórek tworzą połączenie szczelinowe. Natomiast jeden konekson występujący na błonie komórkowej (ang. *hemichannels*) pozwala na kontakt cytoplazmy z macierzą pozakomórkową. Połączenia szczelinowe często występują w grupach (ang. *gap junction plaque*) [71][70]. Połączenia szczelinowe są strukturami dynamicznymi, a wymiana molekuł zachodzi tylko wtedy, kiedy kanał jest otwarty. Otwieranie i zamykanie kanału jest skutkiem odwracalnych zmian konformacyjnych koneksyn w koneksonie. Bramkowanie kanału jest kontrolowane przez wiele czynników, takich jak stężenie wapnia w cytoplazmie, pH, potencjał błon, czy modyfikacje potranslacyjne białek [72][73][74].



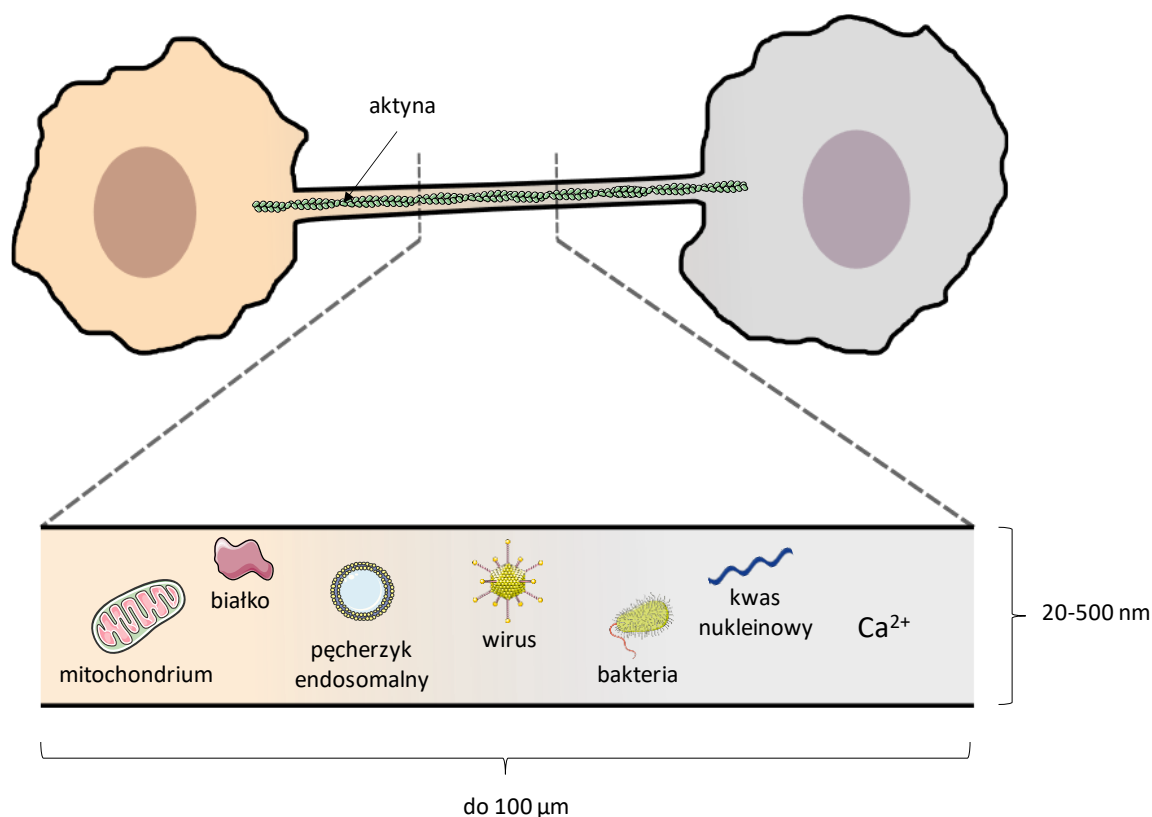
Rycina 5. Schemat połączenia szczelinowego. Opis w tekście.

Biorąc pod uwagę niską specyficzność połączeń szczelinowych, które umożliwiają transfer szerokiej gamy cząsteczek, nie jest zaskakujące, że są one zaangażowane w różnorodne funkcje fizjologiczne w różnych typach komórek. Połączenia te są szczególnie ważne w komunikacji międzykomórkowej podczas embriogenezy, a także w funkcjonowaniu dojrzałych narządów, np. serca [73]. Nasze zrozumienie roli połączeń szczelinowych jest wzbogacane przez kolejne doniesienia o ludzkich chorobach spowodowanych mutacjami w genach kodujących koneksyny [75].

1.4.2 Tunelujące nanorurki

Tunelujące nanorurki (ang. *tunneling nanotubes*, TNTs) są cienkimi wypustkami komórkowymi zawierającymi aktyne, o średnicy od 20 do 500 nm i długości do 100 μm (Ryc. 6). Opisane zostały po raz pierwszy w szczurzych komórkach guza chromochłonnego

PC12 [76]. TNTs tworzą połączenia między komórkami tego samego typu (homotypowe) lub różnego typu (heterotypowe). Nie ograniczają się do jednej pary komórek, lecz tworzą sieć połączeń. Czasami TNTs bywają rozgałęzione [77][76][78][79][78]. Wiele różnych typów komórek tworzy TNT *in vitro*. Natomiast *in vivo* po raz pierwszy TNTs zobrazowano pomiędzy komórkami dendrytycznymi w mysiej rogówce [80]. Osswald *et al.* opisali struktury podobne do TNTs w nowotworach mózgu u myszy [81].



Rycina 6. Schemat tunelującej nanorurki oraz przykłady transportowanych przez nią obiektów. Opis w tekście.

Wykazano, że za pomocą TNT komórki mogą transferować różnego rodzaju materiał cytoplazmatyczny, taki jak priony [82], wirusy [83][84], sygnały apoptotyczne [85], wapń [78], pęcherzyki wewnątrzkomórkowe oraz organelle takie jak mitochondria i lizosomy [76][79]. Ponadto, podczas elongacji TNT, białka powierzchniowe błony oraz bakterie przylegające do błony komórki mogą przemieszczać się do komórki docelowej [86][87][83]. Co ważne, transfer między komórkami może być dwukierunkowy [87].

TNTs nie są strukturami jednorodnymi, nawet TNTs pochodzące od jednej komórki mogą różnić się morfologicznie. W makrofagach opisano dwa rodzaje TNT: cieńsze, zawierające aktynę oraz grubsze ($>0,7 \mu\text{m}$), zawierające zarówno aktynę, jak i mikrotubule.

Te dwa rodzaje TNTs różnią się także funkcją, większy materiał (lizosomy, mitochondria) jest transportowany tylko przez TNTs zawierające mikrotubule [87]. Obecność włókien mikrotubulowych może zapewniać większą sztywność i wytrzymałość TNTs [88]. TNTs są strukturami dynamicznymi, a ich formowanie *de novo* zachodzi już w kilka minut po wysianiu do naczynia hodowlanego, w zależności od rodzaju komórek i warunków hodowli. Połączenia między komórkami trwają od minut do godzin, z przewagą tych krócej trwających, jednak opisywano również TNTs utrzymujące się do nawet 24-48h [76][89][79]. TNTs są strukturami bardzo delikatnymi, wrażliwymi na czynniki fizyczne (długotrwała ekspozycja na światło w mikroskopie) i chemiczne (utrwalanie) [76]. Do tej pory nie jest znany marker TNT, dlatego ich identyfikację opiera się na rozpoznaniu cech morfologicznych [88]. Dupont *et al.* zaproponował trzy cechy fenotypowe definiujące TNT: (i) połączenie między co najmniej dwiema komórkami, (ii) zawartość aktyny (iii) i brak kontaktu z podłożem [90]. Ta ostatnia cecha odróżnia TNT od podobnych cytoplazmatycznych struktur, takich jak filopodia i cytonemy [76].

Istnieją dwa modele tworzenia TNTs. Pierwszy model zakłada elongację wypustek komórkowych zawierających aktynę, takich jak filopodia, w kierunku drugiej komórki. Prawdopodobnie, podobnie jak w wypadku wydłużania filopodiów, dochodzi do zależnej od GTPazy Cdc42 polimeryzacji aktyny [91]. Po zbliżeniu do komórki docelowej, czołowy fragment tworzącego się TNT kontaktuje się z błoną komórki docelowej, w czym udział mogą brać cząsteczki adhezyjne [76]. Drugi mechanizm powstawania TNTs rozpoczyna się bezpośrednim kontaktem komórek w formie synapsy lub fuzji błon, po czym w trakcie oddalania się od siebie komórki tworzą między sobą kanał, czyli TNT. Oba mechanizmy nie wykluczają się i mogą dotyczyć tych samych komórek [92][90]. Molekularny mechanizm odpowiedzialny za formowanie TNTs nie jest do końca poznany. Liczne doniesienia naukowe wskazują, że precyzyjny mechanizm tworzenia TNT zależy od typu komórki. Polimeryzacja aktyny wydaje się być procesem uniwersalnym w tworzeniu TNTs, ponieważ hamowanie polimeryzacji aktyny przy użyciu cytochalazyny D czy latrunkuliny hamuje TNTs [76][82][89][93][87]. Hase *et al.* zaproponował białko M-Sec jako marker i główny czynnik regulujący formowanie TNTs w makrofagach i komórkach HeLa [94].

Definicja TNT wskazuje, że są to kanały otwarte, jednak okazuje się, że kanały TNT nie muszą zapewniać swobodnego połączenia cytoplazm komórek, a inny rodzaj kontaktu. Przykładem są komórki linii Jurkat wywodzącej się z limfocytów T, która

transmituje wirusa HIV używając TNTs bez fuzji błon, zależnie od receptora CD4, prawdopodobnie na skutek trogocytozy końcowej części TNT zakażonej komórki przez komórkę niezakażoną [83]. Innym przykładem jest sytuacja kiedy po ustaniu bezpośredniej interakcji między komórką NK a komórką docelową i rozdzieleniu komórek, zostaje utworzone połączenie TNT, na którego końcu występuje synapsa, w której występuje zagęszczenie receptorów aktywujących, co pozwala na wyzwolenie cytotoksyczności komórki NK [95]. Co więcej, wyniki badań wskazują na udział połączeń szczelinowych występujących na końcu TNT w przekazywaniu sygnału elektrycznego między komórkami. Wydaje się, że połączenia szczelinowe mogą być preferowanym miejscem powstawania TNT w trakcie oddalania się od siebie komórek [96].

Tworzenie TNTs jest promowane przez czynniki prozapalne, takie jak obecność lipopolisacharydu (LPS) [80], TNF- α , INF γ , PMA [97]. Tworzenie TNTs jest stymulowane w komórkach zakażonych wirusem HIV [98]. Do innych czynników indukujących TNTs należy aktywacja ligandem dla receptora śmierci Fas (FasL) [85], H₂O₂ oraz warunki głodzenia komórek (braku surowicy). Tworzenie się TNTs w odpowiedzi na H₂O₂ zachodzi poprzez aktywację czynnika transkrypcyjnego p53 oraz szlaku PI3K/Akt/ mTor [99]. TNTs tworzą się także w odpowiedzi na warunki stresowe charakterystyczne dla nowotworów, takie jak hipoksja [100], kwaśne środowisko [101], a także mogą być indukowane po ekspozycji na chemioterapeutyki [102].

TNTs służą komórkom do transferu różnych cząsteczek, organelli czy sygnałów, które są istotne w homeostazie, ale mają też udział w patogenezie wielu chorób [103]. Przykładem jest transfer mitochondriów między komórkami nowotworowymi, który wzmacnia inwazyjność komórek [104], czy transfer cząsteczek miRNA z komórek nowotworowych do endotelialnych powodujący zmianę fenotypu komórek endotelialnych na sprzyjający przerzutom [105]. Ponadto, przez TNTs transportowane są mitochondria lub białka o charakterze cytoprotekcyjnym, które mogą powodować oporność na leki stosowane w terapii przeciwnowotworowej [106][107][108]. TNTs są strukturami, za pomocą których rozprzestrzeniają się czynniki chorobowe schorzeń neurodegeneracyjnych, takie jak priony [82], Huntingtyna [109], α -synukleina, [110], amyloid [99] i białko Tau [111]. Co więcej, TNTs stanowią drogę ekspansji wirusów [98] i bakterii [87].

Z drugiej strony, TNTs nie tylko biorą udział w progresji i rozprzestrzenianiu się chorób, ale mogą ułatwiać przekazywanie substancji terapeutycznych [102]. Guo *et al.* opisali nową terapię przeciwnowotworową, w której doksorubicyna przekazywana jest z makrofagów do komórek nowotworowych za pomocą TNTs [112]. Dodatkowo, TNTs służą jako droga rozprzestrzeniania się wirusów onkolitycznych i czynnej formy leku aktywowanej przez wirusowe kinazy [113].

Dokładniejsze zrozumienie mechanizmu powstawania TNT może być korzystne dla opracowania terapii chorób, w których TNT odgrywają zasadniczą rolę, w tym chorób nowotworowych, wirusowych i neurodegeneracyjnych. Przykładem może być tolytoksyna z *Scytonema sp.*, która znacząco zmniejszyła liczbę TNTs (bez globalnego uszkodzenia aktywności) i zahamowała transfer mitochondriów i α -synukleiny, które przyczyniają się odpowiednio do progresji nowotworów i choroby Parkinsona [114]

1.4.3 Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. *extracellular vesicles*, EVs) są błonowymi strukturami pochodzenia komórkowego o wielkości od 30 nm do 2000 nm [115]. Pierwsze doniesienie na temat EVs dotyczyło wydzielanych przez aktywowane płytki krwi struktur o właściwościach prokoagulacyjnych, nazwanych płytkowym pyłem (ang. *platelet dust*) [116]. Od tamtego czasu sukcesywnie odkrywano, że EVs są wydzielane przez niemal wszystkie komórki, zwłaszcza ustalone linie komórkowe różnego pochodzenia, w tym komórki układu odpornościowego, układu nerwowego, komórki endotelialne, komórki nowotworowe, a także komórki macierzyste. Dodatkowo, EVs zostały wyizolowane z płynów ciała, takich jak osocze, mocz, nasienie, popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe, mleko, płyn owodniowy, żółć oraz wysięk nowotworowy, co świadczy o tym, że wydzielanie EVs jest zjawiskiem naturalnie występującym w organizmie [117][118].

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EVs) są niejednorodną grupą struktur, do której należą egzosomy (ang. *exosomes*), mikropęcherzki (ang. *microvesicles*, MVs) oraz ciała apoptotyczne. Ich klasyfikacja opiera się na mechanizmie powstawania oraz wielkości, ale różnią się także pod względem innych cech, co zostało podsumowane w Tabeli 1. Warto zaznaczyć, że wraz z nowymi doniesieniami naukowymi ich nomenklatura ulega dynamicznym zmianom. Pomimo znaczącego postępu w tej dziedzinie, terminy „egzosomy” i „mikropęcherzki” są stosowane zamiennie, dlatego często używa się wspólnego określenia „pęcherzyki zewnątrzkomórkowe” dla tych dwóch struktur [115].

MVs powstają poprzez uwypuklenie błony i oderwanie od komórki („pączkowanie”) (Ryc. 7), przez co błona MVs ma zbliżony skład do błony plazmatycznej komórki, z której pochodzi, co pozwala na identyfikację pochodzenia MVs za pomocą swoistych markerów błonowych [115]. MVs mają w swoim składzie białka o różnych funkcjach, takie jak metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (ang. *matrix metalloproteinases*, MMPs), glikoproteiny (GPIb, GPIIb-IIIa oraz selektyna P) integryny (Mac-1), receptory (EGFR) oraz komponenty cytoszkieletu, takie jak β -aktyna i α -aktynina 4 [119]. Uwalnianie MVs jest zależne od jonów wapnia, które wpływają na enzymy odpowiedzialne za organizację lipidów w zewnętrznej i wewnętrznej warstwie błony komórkowej. Wapń aktywuje flipazy oraz hamuje flopazy i skramblazy, co powoduje zmianę układu lipidów w błonie oraz zerwanie wiązań między cytoszkieletem a fosfolipidami. Dodatkowo, wapń aktywuje kalpaniny oraz gelsoniny, które tną białka wiążące aktynę. Wszystkie te zmiany umożliwiają uwypuklenie i rozerwanie błony komórkowej, co jest potrzebne do uwolnienia MVs [120].

Biogeneza egzosomów jest procesem złożonym i rozpoczyna się od powstawania uwypukleń w błonie późnych endosomów do ich wnętrza (Ryc. 7). Skutkuje to utworzeniem ciałek wielopęcherzykowych (ang. *multivesicular body*, MVB). W tworzeniu i transporcie MVB bierze udział kompleks białek ESCRT (ang. *endosomal sorting complex required for transport*) oraz białka z rodziny Rab: Rab11, Rab27a, Rab27b oraz Rab35. Egzosomy są uwalniane poza komórkę poprzez egzocytotę, fuzję MVB z błoną komórkową, co zachodzi przy udziale transbłonowego kompleksu białkowego SNARE (ang. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*). Taki mechanizm powoduje, że błona komórkowa egzosomów jest różna od błony komórkowej komórki rodzicielskiej [121][122]. Niezależnie od pochodzenia, wśród białek egzosomów możemy wyróżnić białka zaangażowane w tworzenie MVB (Alix, TSG101), transport i fuzję błon (aneksyny, flotiliny, GTPazy), adhezję (integryny), prezentację antygenów (ang. *major histocompatibility complex*, MHC), tetraspaniny (CD9, CD63, CD81, CD82), białka szoku cieplnego (ang. *heat shock proteins*, np. HSP70, HSP90) oraz białka związane z lipidami [119].

We wnętrzu EVs transportowane są cząsteczki DNA, RNA, białka, lipidy i metabolity komórkowe [119]. EVs chronią swoją zawartość przed degradacją enzymatyczną w czasie drogi w przestrzeni pozakomórkowej [126]. Zbiór informacji

na temat składu EVs jest sukcesywnie powiększany i aktualizowany w bazach danych, takich jak EVpedia, ExoCarta oraz Vesiclepedia.

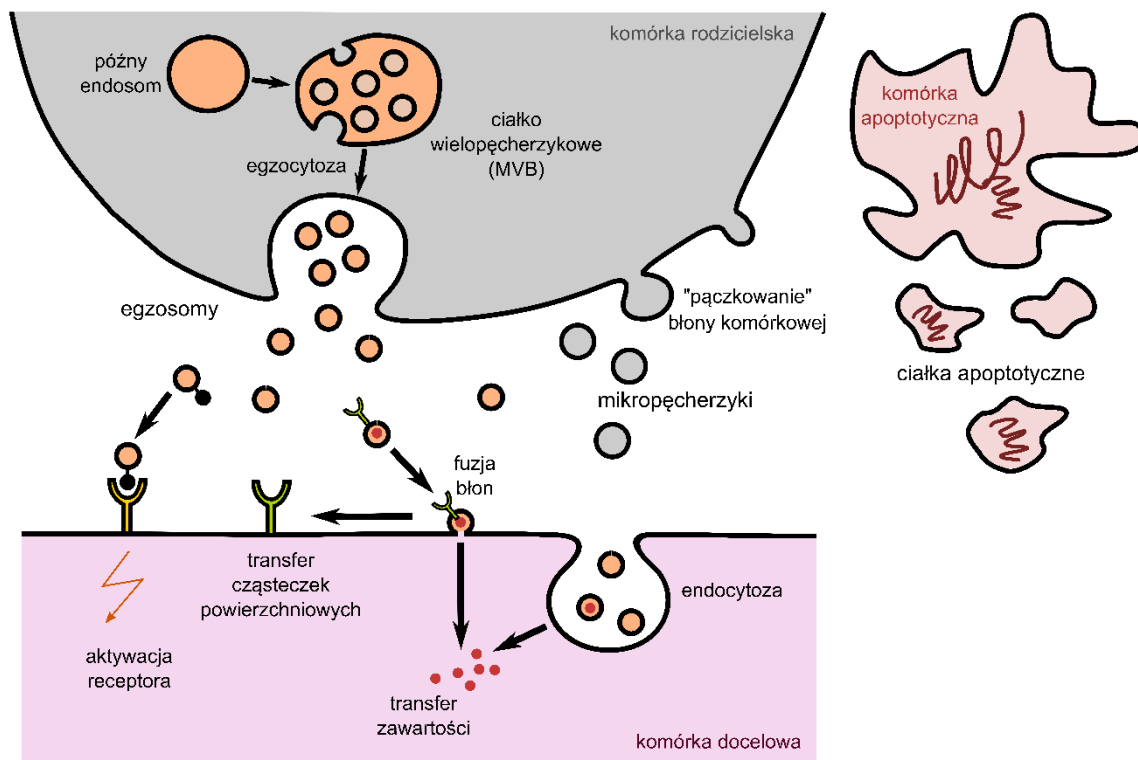
Tabela 1. Charakterystyka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Na podstawie [115], zmodyfikowano.

Rodzaj pęcherzyków	Charakterystyka				
	Powstawanie	Wielkość	Markery błonowe	Zawartość	Ref.
Egzosomy	Fuzja ciałek wielopęcherzykowych z błoną komórkową	30-160 nm	Tetraspaniny: CD81, CD82, CD3, CD63, CD9	mRNA, miRNA, ncRNA, białka cytoplazmatyczne i błonowe, MHC klasy II	[137] [124]
Mikropęcherzyki (MV)	Uwypuklenie błony komórkowej	50-1000 nm	Markery błony plazmatycznej komórki wyjściowej	mRNA, miRNA, ncRNA, białka cytoplazmatyczne i błonowe	[120]
Ciałka apoptotyczne	Uwypuklenie błony komórki apoptotycznej	500-2000 nm	fosfatydyloseryna	Organelle komórkowe, frakcje jądrowe	[125]

Białka mogą być w sposób selektywny pakowane do EVs, czego przykładem jest różnica w składzie między cytokinami związanymi z EVs, a cytokinami rozpuszczalnymi wydzielanymi przez te same komórki [127]. Szereg badań wskazuje, że komórki modulują skład EVs w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne, takie jak hipoksja, szok cieplny, stres oksydacyjny oraz czynniki wewnętrzne, takie jak zakażenie wirusowe. Jednak mechanizm sortowania nie jest do końca poznany [128]. W sortowaniu RNA do EVs sugeruje się udział białek wiążących RNA (ang. *RNA-binding protein*, RBP), takich jak YBX, KRAS, hnRNPA2B1, SYNCRIP, HuR oraz ELAVL1 [129]. Jednak selektywność składu EVs nie musi być zasadą uniwersalną, co pokazano na przykładzie prawie niezmiennego składu miRNA w EVs uwalnianych z komórek trofoblastu w warunkach normalnych i hipoksji [130].

EVs mogą oddziaływać na komórkę docelową w sposób pleiotropowy (Ryc. 7). Po pierwsze, EVs mogą być pobierane drogą endocytozy. Ponadto, w wyniku fuzji z błoną komórki docelowej, EVs mogą transferować receptory lub cząsteczki adhezyjne, a także uwalniać swoją zawartość do cytoplazmy komórki docelowej. Dodatkowo, białka i lipidy na powierzchni EVs mogą aktywować receptory na komórce docelowej [131]. Pobieranie EVs jest procesem wymagającym energii oraz nieuszkodzonego cytoszkieletu. Co ciekawe, zwykle jedna komórka używa więcej niż jednego mechanizmu pobierania EVs. Pobieranie EVs przez komórkę docelową ułatwiają interakcje między białkami, takimi

jak tetraspaniny, integryny, proteoglikany, lektyny. Interakcje białkowe, np. interakcje typu ligand-receptor mają wpływ na specyficzność pobierania EVs [126]. Okazuje się, że dane EVs nie są w równym stopniu pobierane przez różne komórki, co świadczy o pewnej specyficzności komórkowej [132]. Możliwe, że niektóre komórki przyciągają krążące EVs, podczas gdy inne „odrzucają” je, pasywnie lub aktywnie, co wpływa na interakcję EVs z powierzchnią komórki i ich późniejszą internalizację [129].



Rycina 7. Powstawanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i działanie na komórkę docelową. Na podstawie [115], zmodyfikowano. Opis w tekście.

Po dotarciu do cytoplazmy komórki docelowej, zawartość EVs w postaci aktywnych cząsteczek mRNA oraz miRNA może regulować ekspresję białek i genów [133]. Dodatkowo, EVs mogą stymulować określone szlaki sygnałowe w komórce docelowej. Zdolność EVs do regulacji transkryptomu oraz do zmiany sygnałów wewnątrzkomórkowych pozwala indukować zmianę fenotypową komórki docelowej [126]. Ma to duże znaczenie w progresji nowotworu, ponieważ wychwyt EVs pochodzących z komórek nowotworowych przez komórki nienowotworowe może zmienić ich fenotyp z prawidłowego na nowotworowy [134].

EVs odgrywają kluczową rolę w regulacji fizjologicznych procesów, takich jak homeostaza komórek macierzystych [135], regeneracja tkanek [136] i krzepnięcie krwi

[137]. W mózgu oprócz klasycznej neurotransmisji synaptycznej, neurony komunikują się poprzez wydzielanie EVs, które mogą przyczyniać się do szeregu funkcji neurobiologicznych, w tym plastyczności synaptycznej. Przykładem jest zwiększone uwalnianie EVs zawierających receptory neuroprzekaźników przez neurony korowe w następstwie zwiększonej aktywności glutaminergicznej [138][139].

MVs wpływają na odpowiedź immunologiczną na wielu jej etapach, w tym na etapie prezentacji antygenów. Komórki dendrytyczne mogą prezentować antygeny patogenów lub antygeny nowotworowe, pochodzące z egzosomów uwolnionych odpowiednio z komórek zakażonych lub nowotworowych. Ponadto mogą wykorzystywać pobrane z MVs kompleksy MHC-antygen w procesie prezentacji. Z drugiej strony, egzosomy uwalniane przez komórki prezentujące antygen, mają na swojej powierzchni MHC i mogą bezpośrednio aktywować limfocyty T [140][141][142][143]. EVs służą wymianie różnych informacji między komórkami układu odpornościowego oraz docelowymi, co wpływa aktywująco lub hamująco na odpowiedź immunologiczną. Makrofagi zakażone *M. avium* mogą wydelać egzosomy zawierające peptydy, aktywujące w niezakażonych makrofagach receptory Toll-podobne (TLR) i stymulujące w nich odpowiedź zapalną [144]. Natomiast egzosomy pochodzące z komórek nowotworowych mają właściwości immunosupresyjne, mogą hamować proliferację limfocytów T oraz komórek NK, promować różnicowanie limfocytów T regulatorowych oraz mieloidalnych komórek supresorowych, co przyczynia się do progresji nowotworu [122].

Oprócz udziału w progresji nowotworów, EVs przyczyniają się do rozprzestrzeniania wirusów, takich jak HIV, np. poprzez transfer receptora CCR5 na uprzednio niewrażliwe na zakażenie HIV komórki CCR5⁺ [145]. Co więcej EVs mają udział w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych poprzez transfer peptydów amyloidowych i α -synukleiny, które bezpośrednio przyczyniają się odpowiednio do choroby Alzheimera i choroby Parkinsona, a także prionów [146][147][148].

Biorąc pod uwagę udział w różnych stanach chorobowych, EVs oraz ich komponenty stanowią nowy cel terapeutyczny. Ponadto, same EV mogą być wykorzystane bezpośrednio w terapii, np. w regeneracji tkanek, czy jako czynniki immunomodulujące [115]. Przykładem może być wykorzystanie EVs uwalnianych z mezenchymalnych komórek macierzystych (ang. *mesenchymal stem cells*, MSCs) do regeneracji mięśnia

sercowego po zawale [149], czy EVs z komórek dendrytycznych stymulowanych antygenami nowotworowymi w immunoterapii nowotworów [150]. Rosnąca w ostatnich latach liczba badań wskazuje, że oprócz wykorzystywania EVs jako jednostek terapeutycznych samych w sobie, EVs mogą posłużyć jako biologiczne nośniki do skutecznego dostarczania leków do komórek docelowych, w tym przez różne bariery biologiczne. Zaletą EVs jest brak immunogenności (EVs izolowane od pacjenta) oraz zmniejszona toksyczność leku zamkniętego w porównaniu do wolnego, natomiast wśród wad należy wymienić trudności w izolacji oraz niski uzysk [151]. EVs próbuje się stosować jako nośniki leków cytotoksycznych, czego przykładem jest enkapsulacja doksorubicyny do egzosomów (exoDOX) pozwalająca na uzyskanie lepszego efektu terapeutycznego przy zmniejszonej kardiotoxyczności [152] oraz egzosomy z palitakselem (exoPTX), które wykazywały zwiększony tropizm i większą skuteczność w leczeniu przerzutów płucnych opornych wielolekowo [153]

W związku z obecnością EVs w płynach ustrojowych oraz faktem, że skład MVs jest pewnym odzwierciedleniem rodzaju i stanu fizjologicznego komórki rodzicielskiej, MVs próbuje się wykorzystać jako biomarkery w diagnostyce chorób takich jak nowotwory, choroby neurodegeneracyjne, autoimmunologiczne, uszkodzenia narządów, w tym zawał mięśnia sercowego [151][154].

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Hb jest białkiem występującym w krwinkach czerwonych, biorącym udział w transporcie gazów oddechowych: tlenu i dwutlenku węgla. W związku z pełnieniem ważnej funkcji w organizmie, Hb jest cząsteczką szczegółowo zbadaną. Zgodnie z dotychczasową wiedzą, pozakomórkowa Hb jest wychwytywana przez makrofagi, gdzie ulega degradacji. Jednak w badaniach naszego zespołu zaobserwowaliśmy, że w warunkach *in vitro* Hb może być przekazywana z makrofagów do komórek nowotworowych, co stanowi nowe zjawisko, różne od kanonicznego. Proces przekazywania Hb jest podstawą nowego, badanego przez nasz zespół systemu dostarczania leków w terapii przeciwnowotworowej, w którym wykorzystujemy makrofagi jako nośniki leków skoniugowanych z Hb.

Celem pracy doktorskiej było:

- zbadanie pobierania Hb przez makrofagi;
- weryfikacja procesu przekazywania Hb z makrofagów do komórek nowotworowych różnymi metodami;
- sprawdzenie przekazywania Hb między makrofagami;
- scharakteryzowania procesu przekazywania Hb;
- zbadanie mechanizmu przekazywania Hb z makrofagów do komórek nowotworowych.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Hodowla komórkowa

W doświadczeniach wykorzystano następujące linie komórkowe zakupione w Amerykańskiej Kolekcji Hodowli Komórkowych, ATCC (ang. *American Type Culture Collection*) lub Imanis:

- ludzka linia komórek ostrej białaczki monocytarnej THP-1 (ATCC® TIB-202™)
- mysia linia makrofagowa RAW 264.7 (ATCC® TIB-71™)
- ludzka linia nowotworu sutka MDA-MB-231(ATCC® HTB-26™)
- ludzka linia raka jajnika SKOV-3 (ATCC® HTB-77™)
- ludzka linia raka jelita grubego LoVo (ATCC ® CCL-229™)
- ludzka linia raka szyjki macicy HeLa (ATCC® CCL-2™)
- mysia linia gruczolakoraka okrężnicy CT26.WT (ATCC® CRL-2638™)
- mysia linia nowotworu sutka 4T1-Fluc-Neo (Imanis, CL020).

Mysia linia nowotworu sutka E0771-LG została pozyskana dzięki uprzejmości Dr. Takanori Kitamura z Uniwersytetu w Edynburgu.

Wszystkie czynności związane z hodowlą komórkową wykonywano w warunkach sterylnych, w komorach z laminarnym przepływem powietrza i filtrami HEPA. Hodowle prowadzono w inkubatorach (NuAire) zapewniających standardowe warunki: 37°C, 5% CO₂ oraz wilgotność 95%. Komórki THP-1, MDA-MB-231, SKOV-3, CT26.WT, E0771-LG oraz 4T1-Fluc-Neo hodowano w pożywce RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), natomiast komórki RAW 264.7, LoVo i HeLa hodowano w pożywce DMEM z zawartością glukozy 4,5 g/l (Corning). Pożywki hodowlane wzbogacaono o 10 % płodową surowicę bydlęcą, FBS (ang. *fetal bovine serum*, HyClone) oraz mieszaninę antybiotyków: 100 I.U./ml penicyliny i 100 µg/ml streptomycyny (Sigma-Aldrich). Dodatkowo, do pożywki hodowlanej dla komórek 4T1-Fluc-Neo dodawano 0,1 mg/ml genetycyny (Gibco), natomiast do pożywki hodowlanej dla komórek THP-1 dodawano 0,05 mM 2-mercaptoetanolu (Gibco).

Komórki rosnące w zawiesinie (THP-1) utrzymywano w gęstości 0,2-1 mln/1 ml pożywki i pasażowano co 2-3 dni. Komórki przenoszono do probówek, wirowano (400 rcf, 5 minut, 4°C), a następnie zawieszano w odpowiedniej ilości świeżej pożywki hodowlanej. Komórki adherentne hodowano do osiągnięcia konfluencji 80% i pasażowano co 2-3 dni.

W celu odklejenia komórek od powierzchni naczynia hodowlanego, usuwano pożywkę nad komórkami, komórki przepłukiwano roztworem PBS (ang. *phosphate-buffered saline*), a następnie dodawano roztwór trypsyny z EDTA (Sigma) i inkubowano przez kilka minut w temp. 37°C. Trypsynę inaktywowano poprzez dodanie świeżej pożywki. Taką zawiesinę wirowano (400 rcf, 5 minut, 4°C), a następnie zawieszano w odpowiedniej ilości świeżej pożywki hodowlanej. Wyjątek stanowiła linia RAW264.7, której komórki odklejano za pomocą skrobaka (Gibco).

Do liczenia komórek oraz oceny żywotności wykorzystywano błękit trypanu. Zawiesinę komórek mieszano z roztworem błękitu trypanu 1:1, a następnie umieszczano w specjalnej płytce (NanoEnTek) i wprowadzano do automatycznego licznika komórek EVE Automated Cell Counter (NanoEnTek).

Do mrożenia komórki były zawieszane w pożywce hodowlanej z dodatkiem 5-10% DMSO. Zawiesina komórek była przenoszona do kriotubek, które były umieszczane w pojemniku zapewniającym powolną zmianę temperatury i przechowywane w temperaturze -80°C przez 24-48 h, a następnie przenoszone do pojemników z ciekłym azotem w celu długoterminowego przechowywania. Komórki przeznaczone do rozmrożenia były wyjmowane z pojemników zawierających ciekły azot i rozmrażane w temperaturze 37°C. Następnie zawiesina komórek była przenoszona do probówki z medium hodowlanym, wirowana (400 rcf, 5 minut, 4°C) w celu usunięcia DMSO, po czym komórki były zawieszane w świeżym medium hodowlanym.

Wszystkie linie komórkowe były regularnie sprawdzane pod kątem obecności zakażenia bakteriami *Mycoplasma spp.* techniką PCR. Jedynie komórki niezakażone były wykorzystywane w doświadczeniach.

3.2 Izolacja jednojądrzastych komórek krwi obwodowej

Komórki jednojądrzaste krwi obwodowej, PBMC (ang. *peripheral blood mononuclear cells*) izolowano z kożuchów leukocytno-płytkowych pozyskanych z krwi anonimowych, zdrowych dawców z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Warszawie. Zawiesina komórek była rozcieńczana PBS 1:1, nawarstwiana na płyn gradientowy LymphoprepTM (STEMCELL Technologies), a następnie wirowana z wyłączonym hamulcem wirówki (750 rcf, 30 minut, temp. pokojowa). Komórki jednojądrzaste zebrane pipetą pasterowską ze środkowej warstwy, były płukane dwukrotnie PBS (400 rcf, 5 minut, 4°C), po czym liczone. Do liczenia zawiesinę komórek

mieszano z płynem Türka w proporcji 1:9, a następnie umieszczano w hemocytometrze Bürkera. Płyn Türka zawiera kwas octowy, który powoduje lizę erytrocytów, oraz fiolet krystaliczny, który barwi jądra leukocytów na niebiesko. Zliczano komórki z 25 małych kwadratów, a następnie obliczano liczbę komórek w 1 ml, ze wzoru uwzględniającego rozmiar hemocytometru i rozcieńczenie komórek płynem Türka:

$$\text{Liczba komórek w 25 polach} \times 100\,000 = \text{liczba komórek 1 ml.}$$

3.3 Izolacja monocytów z jednojądrzastych komórek krwi obwodowej

Monocyty CD14+CD16- izolowano z PBMC przez negatywną selekcję immunomagnetyczną przy użyciu zestawu EasySep™ Human Monocyte Isolation Kit (STEMCELL Technologies) zgodnie z protokołem producenta. W skrócie, komórki były zawieszane w buforze PBS zawierającym 1 mM EDTA i 2 % FBS, po czym dodawano mieszaninę biotynylowanych przeciwciał znakujących główne białka powierzchniowe charakterystyczne dla komórek innych niż monocyty. Następnie dodawano mieszaninę kulek magnetycznych opłaszczonych streptawidyną, po czym probówkę z zawiesiną komórkową umieszczano w magnesie. W wyniku oddziaływania biotyny i streptawidyny, komórki związane z przeciwciałami podlegały odsortowaniu na magnesie, natomiast monocyty pozostawały niezwiązane w zawiesinie.

3.4 Izolacja mysich komórek szpikowych

Komórki szpikowe izolowano z kości udowych i piszczelowych 6-8 tygodniowych samic myszy szczepu BALB/c. Wypreparowane kości z odciętymi nasadami umieszczano w specjalnie przygotowanej probówce typu Eppendorf, w której uprzednio umieszczono końcówki do pipety automatycznej przycięte tak, aby kość zachowała pionową orientację i uniemożliwić jej kontakt z dnem probówki. Probówki z kośćmi wirowano (1000 rcf, 1 minuta, temp. pokojowa), co pozwoliło na pozyskanie szpiku na dnie probówki typu Eppendorf. Komórki zawieszano w buforze do lizy erytrocytów ACK Lysing Buffer (Gibco), inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej i filtrowano przez sitko komórkowe o średnicy porów 70 µm, po czym płukano PBS i wirowano (400 rcf, 5 minut, 4°C). Uzyskane komórki szpikowe różnicowano do makrofagów (rozdział 3.5).

3.5 Różnicowanie komórek do makrofagów

W celu różnicowania komórek linii THP-1 do makrofagów, komórki wysiewano na 10-cm szalki Petriego w ilości 6 mln w 10 ml standardowej pożywki dodatkiem 100 ng/ml octanu

mirystynianu forbolu, PMA (ang. *Phorbol 12-myristate 13-acetate*) i inkubowano przez 24 h (37 °C, 5% CO₂). Po tym czasie pożywkę hodowlaną wymieniano na świeżą, bez dodatku PMA i hodowano przez kolejne 24 h (37 °C, 5% CO₂).

W celu różnicowania ludzkich monocytów izolowanych z krwi, komórki wysiewano na 10-cm szalki Petriego w ilości 5 mln w 10 ml pożywki Macrophage Generation Medium DXF (PromoCell) z dodatkiem mieszaniny suplementów (PromoCell) oraz 50 ng/ml ludzkiego czynnika stymulującego wzrost kolonii makrofagów, M-CSF, (ang. *macrophage colony-stimulating factor*, PromoCell). Komórki hodowano przez 7 dni (37°C, 5% CO₂), przy czym w dniu 4. wymieniano pożywkę hodowlaną na świeżą.

W celu różnicowania mysich komórek szpikowych do makrofagów, komórki wysiewano na 10-cm szalki Petriego w ilości 2 mln w 5 ml pożywki hodowlanej DMEM/F-12, GlutaMAX™ Supplement (Gibco) z dodatkiem 10% FBS, antybiotykami (100 I.U./ml penicyliny, 100 µg/ml streptomycyny) oraz 20% pożywki kondycjonowanej znad mysich fibroblastów L929 i inkubowano przez 7 dni (37 °C, 5% CO₂), przy czym w dniu 3. dodawano 5 ml świeżej pożywki.

Zróżnicowane makrofagi odklejało od powierzchni naczynia hodowlanego przy użyciu odczynnika CellStripper® (Corning), płukano PBS i wykorzystywano do doświadczeń.

3.6 Koniugacja białek z barwnikami fluorescencyjnymi

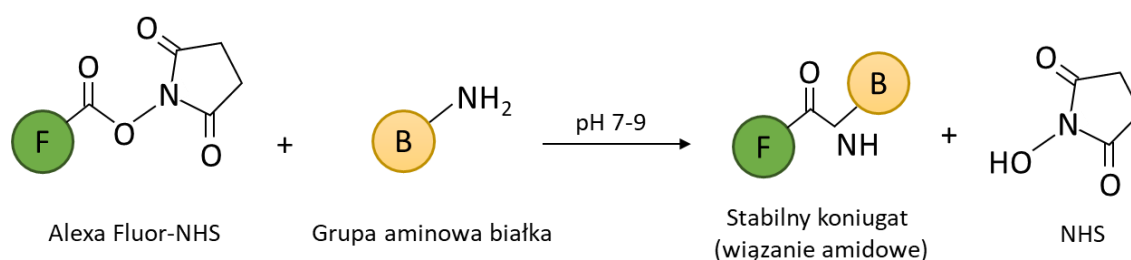
Koniugację prowadzono z wykorzystaniem estrów N-hydroksy-sukcynimidu (NHS) barwnika fluorescencyjnego Alexa Fluor™ 488 (Invitrogen) lub Alexa Fluor™ 568 (Invitrogen) oraz barwnikiem Alexa Fluor™ 568 (Invitrogen) zawierającym grupę maleimidową (Tab. 2). Grupa NHS barwnika wykazuje reaktywność z grupami aminowymi obecnymi w białku tworząc trwałe wiązanie amidowe (Ryc. 8), natomiast grupa maleimidowa barwnika wykazuje reaktywność z grupami sulfhydryłowymi białka, w wyniku czego powstaje stabilne wiązanie tioeterowe (Ryc. 9).

Hb (Sigma lub LEE Biosolution) lub surowicza albuminę wołową (ang. *bovine serum albumin*, BSA) (Biosera) rozpuszczano w 0,1 M NaHCO₃ o pH 8,3. Ester NHS barwnika Alexa Fluor™ rozpuszczano w DMSO, a następnie rozcieńczano 0,1 M NaHCO₃ o pH 8,3. Roztwór fluorochromu i roztwór białka mieszano w stosunku objętościowym 1:1, przy zachowaniu stosunku molowego fluorochromu do białka 2,5: 1. Mieszaninę

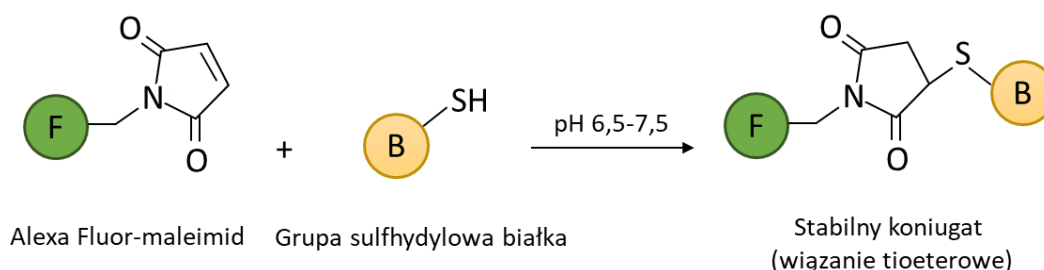
inkubowano przez 45 minut w temperaturze pokojowej z ciągłym mieszaniem, a następnie płukano i zatężono przy użyciu specjalnych probówek filtracyjnych Amicon® Ultra-15 (Merck Millipore) z porami 10 kDa wobec 0,1 M NaHCO₃ pH 8,3. Probówki filtracyjne pozwoliły na jednoczesne oczyszczanie koniugatu od wolnego fluorochromu oraz zatężanie koniugatu.

Tabela 2. Koniugacja białek z barwnikami fluorescencyjnymi.

fluorochrom	grupa funkcyjna fluorochromu	grupa funkcyjna białka	bufor reakcyjny	stosunek molowy fluorochrom : białko w reakcji	warunki reakcji
Alexa Fluor™ 488	ester NHS	grupy aminowe	0,1 M NaHCO ₃ pH 8,3	2,5 : 1	45 minut, temp. pokojowa
Alexa Fluor™ 568	ester NHS	grupy aminowe	0,1 M NaHCO ₃ pH 8,3	2,5 : 1	45 minut, temp. pokojowa
Alexa Fluor™ 568	maleimid	grupy sulfhydrylowe	25 mM HEPES, 10 mM (NH ₄)SO ₄ , 10 mM metionina, 0,1 mM EDTA, pH 7	5 : 1	3 godziny, 4°C



Rycina 8. Schemat reakcji fluorochromu zawierającego ester NHS z białkiem.



Rycina 9. Schemat reakcji fluorochromu zawierającego maleimid z białkiem.

Alternatywnie, Hb rozpuszczono w buforze (25 mM HEPES, 10 mM (NH₄)SO₄, 10 mM metionina, 0,1 mM EDTA, pH 7). Maleimid Alexa Fluor™ rozpuszczono

w DMSO, dodano do roztworu Hb przy zachowaniu 5-krotnego nadmiaru molowego fluorochromu wobec białka. Mieszaninę inkubowano przez 3 godziny w 4°C, a następnie płukano i zatężono przy użyciu specjalnych probówek filtracyjnych Amicon® Ultra-15 (Merck Millipore) z porami 10 kDa wobec 0,1 M NaHCO₃ pH 8,3.

Stężenie Hb obliczano na podstawie Prawa Lamberta-Beera i molowego współczynnika absorpcji hemu (167000 M⁻¹·cm⁻¹) przy 405 nm. Stężenie molowe obliczano ze wzoru:

$$c = A : (\epsilon \cdot l),$$

gdzie:

c - stężenie [M]

A - absorbancja roztworu Hb przy 405 nm

ϵ -167000 [M⁻¹·cm⁻¹]

l - grubość warstwy absorbującej [cm].

Stężenie BSA mierzono na spektrofotometrze NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) przy użyciu modułu dla białek.

Wydajność koniugacji sprawdzano przy użyciu spektroskopii masowej w Środowiskowym Laboratorium Spektrometrii Mas działającym w Instytucie Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk.

3.7 Modyfikacja komórek za pomocą siRNA

Do zmniejszenia ilości białka M-Sec (TNFAIP2) w komórkach wykorzystano cząsteczki siRNA, czyli małych interferencyjnych RNA (ang. *small interfering RNA*). Są to sekwencje komplementarne do danego mRNA, które po przyłączeniu powodują degradację mRNA. W doświadczeniach wykorzystano cząsteczki siRNA zakupione w ThermoFisher Scientific:

- Silencer® Select TNFAIP2 (assay ID s14256)
- kontrola negatywna-Silencer® Select Negative Control #1

Komórki wykorzystywano do inkubacji z Hb i kohodowli, przy czym część komórek zachowywano do sprawdzenia wydajności zmniejszenia ilości białka metodą Western blot.

3.7.1 Elektroporacja komórek THP-1

Komórki THP-1 przenoszono do probówek i wirowano (400 rcf, 5 minut, 4°C). 2 mln komórek zawieszano w 0,4 ml pożywki Opti-MEM (Gibco) bez dodatku surowicy, następnie dodawano siRNA w takiej ilości, aby stężenie końcowe wynosiło 250 nM. Całość mieszaniny przenoszono do specjalnych 4-mm kuwet (Bio-Rad) i umieszczano w elektroporatorze Gene Pulse Xcell (Bio-Rad), po czym generowano impuls elektryczny przy parametrach aparatu: Square wave; 260 V; 10 ms x 3. Niezwłocznie po zakończeniu procedury, komórki przenoszono do 2 ml ogrzanej uprzednio pożywki RPMI-1640 wzbogaconej o 10% FBS, antybiotyki (100 I.U./ml penicylina, 100 µg/ml streptomycyna) oraz 100 ng/ml PMA i hodowano w standardowych warunkach (37 °C, 5% CO₂). Po 24 godzinach pożywkę zbierano, komórki płukano PBS i dodawano świeżą pożywkę bez PMA i hodowano przez kolejne 24 godziny. Po tym czasie komórki wykorzystywano w eksperymentach.

3.7.2 Transfekcja komórek MDA-MB 231 za pomocą Lipofektaminy

Komórki nowotworowe MDA-MB 231 wysiewano w liczbie 240 tys. na dołek płytki 6-dołkowej, w pożywce hodowlanej RPMI-1640 wzbogaconej o 10% FBS oraz antybiotyki i hodowano w standardowych warunkach (37 °C, 5% CO₂). Po 24 godzinach przygotowywano siRNA: najpierw rozcieńczano siRNA w 200 µl pożywki Opti-MEM. Niezależnie, do 200 µl pożywki Opti-MEM dodawano 4 µl Lipofektaminy (Lipofectamine® RNAiMAX Reagent, ThermoFisher Scientific). Następnie mieszaninę inkubowano przez 5 min. w temp. pokojowej, po czym łączono je i inkubowano przez 20 min. w temp. pokojowej. Pożywkę znad komórek nowotworowych usuwano, komórki płukano PBS, dodawano 1,6 ml pożywki DMEM bez dodatku surowicy i przygotowaną mieszaninę siRNA oraz Lipofektaminy. Końcowe stężenie siRNA skierowanego przeciw M-Sec wynosiło 20 nM, natomiast siRNA kontrolnego 50 nM. Komórki hodowano przez 24 godziny, po czym usuwano pożywkę, płukano PBS i dodawano świeżą pożywkę RPMI. Komórki hodowano przez następne 24 godziny i wykorzystywano w eksperymentach.

3.8 Inkubacja komórek z białkami

Komórki odklejano od powierzchni naczynia hodowlanego, płukano PBS (400 rcf, 5 minut, 4°C) i liczono. Następnie zawieszano w roztworze białka-Alexa Fluor™ o stężeniu 1 mg/ml (lub innym stężeniu, jeśli wymagało tego doświadczenie) w stałej proporcji

10 mln komórek na 1 ml roztworu białka. Roztwór białka był przygotowany w pożywce hodowlanej, bez dodatku FBS. Zawiesinę inkubowano przez 1h (37 °C, 5% CO₂), po czym płukano trzykrotnie PBS (400 rcf, 5 minut, 4°C). Następnie komórki liczono i wykorzystywano do doświadczeń.

3.9 Monohodowle i kohodowle komórkowe

3.9.1 Przygotowanie makrofagów

Do badania przekazywania Hb lub BSA, makrofagi inkubowano z roztworem białka-Alexa FluorTM zgodnie z opisem w rozdziale 3.8. Do badania transferu pęcherzyków wewnątrzkomórkowych, makrofagi będące na szalce barwiono fluorescencyjnym, lipofilnym barwnikiem DiD (Invitrogen). Usuwano pożywkę z nad komórek, płukano PBS, po czym dodawano roztwór DiD w stężeniu 5 µg/ml i inkubowano przez 30 min (37 °C, 5% CO₂). Po tym czasie usuwano roztwór barwnika, płukano PBS, a następnie dodawano świeżą pożywkę hodowlaną i inkubowano (37 °C, 5% CO₂) przez kolejne 16 godzin. Przed wysiewaniem kohodowli komórki odklejano i liczono.

3.9.2 Przygotowanie komórek nowotworowych

W celu odróżnienia od makrofagów, przed wysianiem do eksperymentu, komórki nowotworowe barwiono fluorescencyjnie przy użyciu CellTraceTM Violet Cell Proliferation Kit (Invitrogen) lub CellTraceTM Far Red Cell Proliferation Kit (Invitrogen) zgodnie z protokołem producenta, w stężeniu końcowym barwnika, odpowiednio, 2,5 µM lub 1 µM. Alternatywnie, komórki nowotworowe barwiono przy użyciu CellTrackerTM Orange CMTMR (Invitrogen) zgodnie z protokołem producenta, w stężeniu końcowym barwnika 5 µM. Po krótko, komórki odklejano trypsyną z dodatkiem EDTA, płukano PBS (400 rcf, 5 minut, 4°C) i liczono. Następnie komórki zawieszano w roztworze barwnika inkubowano przez 20 min (37 °C, 5% CO₂). Po tym czasie do mieszaniny dodawano świeże medium hodowlane zawierające FBS, który wiązał wolny barwnik, po czym inkubowano przez kolejne 5 minut (37 °C, 5% CO₂). Następnie komórki wirowano (400 rcf, 5 minut, 4°C) i liczono.

3.9.3 Opracowanie warunków kohodowli

Makrofagi i komórki nowotworowe wysiewano w stosunku 2:1 w pożywce hodowlanej RPMI-1640 wzbogaconej o 5% FBS oraz antybiotyki (100 I.U./ml penicylina, 100 µg/ml streptomycyna) i hodowano w standardowych warunkach (37 °C, 5% CO₂) w naczyniu

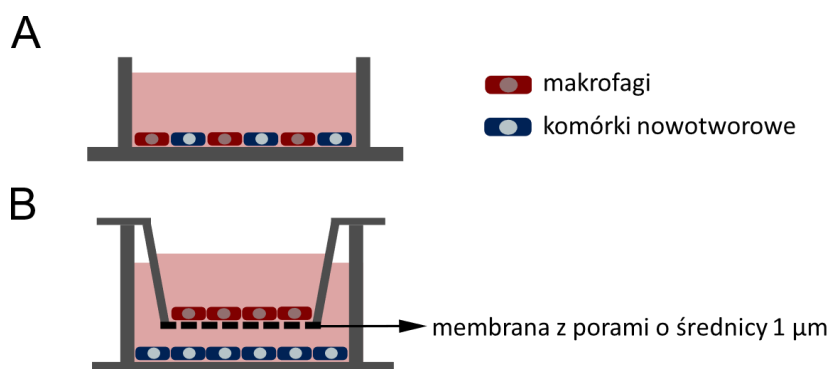
hodowlanym (Ryc. 10A). W wypadku kohodowli z makrofagami pochodzenia szpikowego (BMDM), do pożywki dodawano 5 mg/ml M-CSF.

Dodatkowo, podczas kohodowli wykorzystywano następujące związki dodawane do pożywki hodowlanej, które zostały wymienione w Tabeli 3.

Tabela 3. Związki wykorzystywane podczas kohodowli.

Nazwa związku	Producent	Opis	Stężenie końcowe
monenzyna (Golgi Stop)	BD	Inhibitor wewnątrzkomórkowego transportu białek	1:1000
brefeldyna A (Golgi Plug)	BD	Inhibitor wewnątrzkomórkowego transportu białek	1:1000
cytochalazyna D	Life Technologies	inhibitor polimeryzacji aktyny	2 μ M
latrunkulina B	Sigma	inhibitor polimeryzacji aktyny	1 μ M
nokodazol	Sigma	inhibitor polimeryzacji mikrotubul	2 μ M
CK666	Sigma	inhibitor Arp2/3	40 μ M
ML141	Sigma	inhibitor GTPazy Cdc42	10 μ M
H1152	Merck	inhibitor Rho-zależnej kinazy ROCK	20 μ M
Y27632	Sigma	inhibitor Rho-zależnej kinazy ROCK	10 μ M
rhosin	Merck	inhibitor Rho	30 μ M

Do doświadczeń mających na celu zbadanie komórek w kohodowli bez bezpośredniego kontaktu, zastosowano płytki Transwell®. Na dno płytek wysiewano komórki nowotworowe, natomiast makrofagi wysiewano na membranę insertu (Ryc. 10B). Membrana posiada pory o średnicy 1 μ m, co pozwala na wymianę pożywki między dolną a górną częścią płytki.



Rycina 10. Schemat wysiewania komórek do kohodowli. A. Kohodowla z zachowaniem bezpośredniego kontaktu między makrofagami a komórkami nowotworowymi. B. Kohodowla na płytkach Transwell®, bez bezpośredniego kontaktu między makrofagami a komórkami nowotworowymi.

Do analizy z wykorzystaniem spektroskopii korelacji fluorescencji, makrofagi różnicowane z linii THP-1 przygotowywano zgodnie z opisem w rozdziale 3.8 z jedną zmianą: makrofagi inkubowano w mieszaninie 10 μ g/ml Hb-Alexa Flor 568 i 990 μ g/ml

nieznakowanej Hb (w sumie, stężenie Hb wynosiło 1 mg/ml). Komórki MDA-MB-231 odklejano trypsyną z dodatkiem EDTA, płukano PBS (400 rcf, 5 minut, 4°C) i liczono. Następnie 5×10^4 makrofagów THP-1 i $2,5 \times 10^4$ komórek MDA-MB-231 wysiewano na 8-studzienkowe szklane płytki (ibidi) w 300 μ l pożywki RPMI-1640 wzbogaconej o 5% FBS oraz antybiotyki (100 I.U./ml penicylina, 100 μ g/ml streptomycyna) i hodowano w standardowych warunkach (37 °C, 5% CO₂).

3.9.4. Medium kondycjonowane

W dniu „0” makrofagi inkubowane z Hb (zgodnie z podrozdziałem 3.8) oraz komórki nowotworowe wysiewano jako monohodowlę w pożywce hodowlanej RPMI-1640 wzbogaconej o 5% FBS oraz antybiotyki (100 I.U./ml penicylina, 100 μ g/ml streptomycyna) na dołki płytki 24-dołkowej. Dodatkowo, wysiewano kohodowlę makrofagów inkubowanych uprzednio z Hb z komórkami nowotworowymi (zgodnie z podrozdziałem 3.9.3). Komórki hodowano w standardowych warunkach (37 °C, 5% CO₂) przez 24 godziny. Po tym czasie, w dniu „1”, medium znad komórek nowotworowych usuwano, a medium znad makrofagów oraz kohodowli zbierano i wirowano (1000 rcf, 10 min.), następnie dodawano do komórek nowotworowych. Komórki z kohodowli analizowano przy użyciu cytometrii przepływowej. Po kolejnych 24 godzinach hodowli (dzień „3”) komórki nowotworowe zbierano i analizowano przy użyciu cytometrii przepływowej.

3.10 Izolacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs)

W celu wyizolowania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez makrofagi THP-1, komórki te inkubowano z Hb lub Hb sprzężoną z AF488 (zgodnie z podrozdziałem 3.8), a następnie wysiewano w liczbie 20-30 mln w pożywce bez dodatku surowicy i hodowano w standardowych warunkach (37 °C, 5% CO₂) przez 24 godziny. Po tym czasie zbierano pożywkę znad komórek i wirowano (400 rcf, 10 minut, temp. pokojowa). Kolejnym etapem było zagęszczenie pożywki poprzez wirowanie (4000 rcf, 37°C) w specjalnych próbkach wirówkowych z membraną, która zatrzymuje cząsteczki większe niż 100 kDa (Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit, Merck Millipore) do uzyskania objętości 1 ml. Z tak przygotowanych próbek izolowano pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. Izolacja była wykonywana przez mgr Magdalenę Długolecką i dr Małgorzatę Czystowską-Kuźmich z Zakładu Biochemii Wydziału Farmaceutycznego WUM. W skrócie, próbki wirowano (2000 rcf, 10 minut, temp. pokojowa) w celu pozbycia

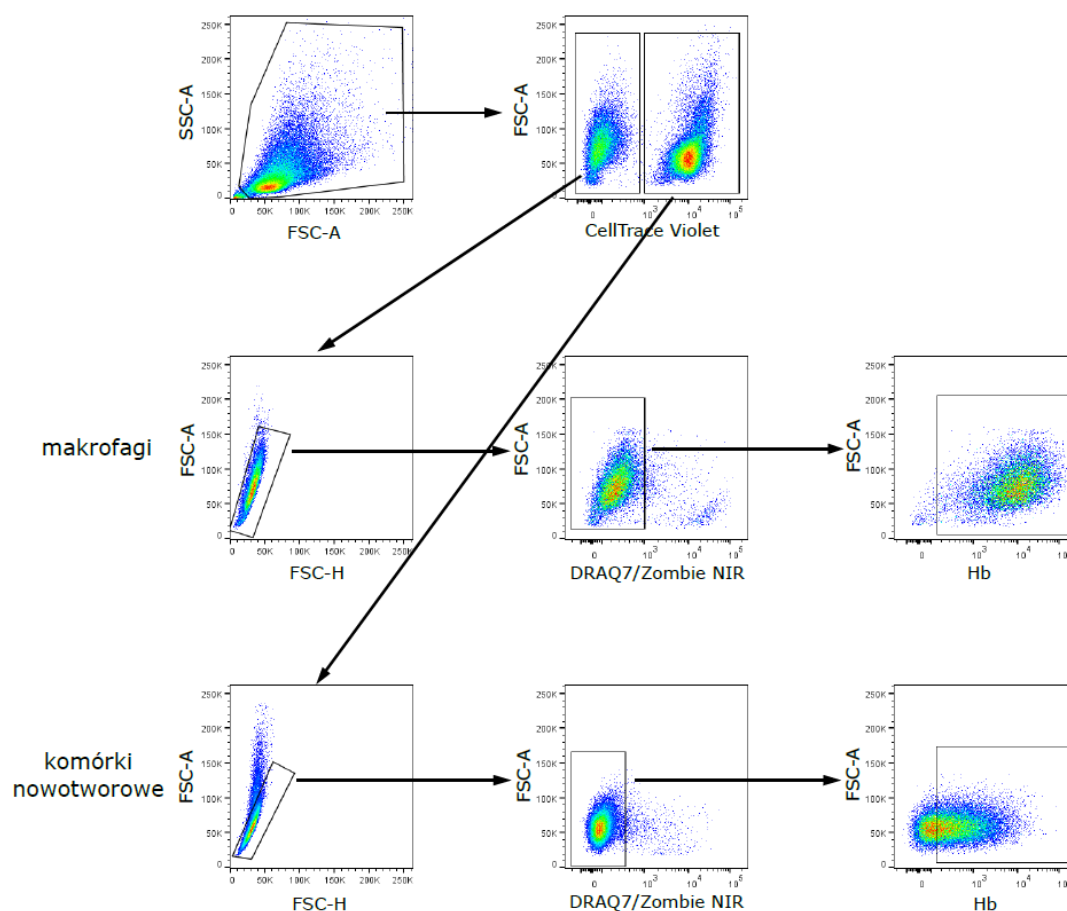
się pozostałości komórek, po czym supernatant jeszcze raz wirowano (10000 rcf, 30minut, 4°C), aby pozbyć się większych mikropęcherzyków i ciałek apoptotycznych. Tak przygotowane próbki poddawano frakcjonowaniu zależnemu od rozmiaru na kolumnach (ang. *Size Exclusion Chromatography* - SEC). Jako eluent użyto PBS, zbierano frakcje o objętości 1 ml. Pierwsze trzy frakcje odrzucano, natomiast frakcje 4-6 poddawano analizie NTA (ang. *Nanoparticle Tracking Analysis*) aparacie ZetaView PMX220 (Particle Metrix). Analiza NTA pozwala na pomiar wielkości i stężenia pęcherzyków, w tym znakowanych fluorescencyjnie.

3.10.1 Pobieranie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez komórki nowotworowe

Komórki nowotworowe linii SKOV-3 i MDA-MB-231 wysiewano w liczbie 300 tys. na dołek płytki 24-dółkowej i hodowano w standardowych warunkach (37 °C, 5% CO₂) przez 24 godziny. Następnie pożywkę wymieniano na świeżą, zmieszaną z frakcją EVs w stosunku objętościowym 1:1, po czym i hodowano przez kolejne 24 godziny. Po tym czasie, komórki przygotowywano do analizy metodą cytometrii przepływowej.

3.11 Cytometria przepływowa

Po upływie odpowiedniego czasu kohodowli (2-48 h.), komórki odklejało trypsyną z dodatkiem EDTA, płukano PBS (400 rcf, 5 minut, 4°C), po czym zawieszano w roztworze barwnika Zombie NIR™ Fixable Viability Kit (BioLegend, 1:400) pozwalającego ocenić żywotność i inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie płukano PBS (400 rcf, 5 minut, 4°C) i zawieszano w buforze BD FACSCFlow™. Alternatywnie, komórki po odklejeniu i płukaniu PBS zawieszano w BD FACSCFlow™ zawierającym inny barwnik pozwalający ocenić żywotność DRAQ7 (BioLegend, 1:400) lub buforze BD FACSCFlow™ bez dodatków. Tak przygotowane komórki analizowano przy pomocy cytometru przepływowego FACS Aria (BD) lub FACSCanto II (BD). Dane z cytometru analizowano za pomocą oprogramowania FlowJo. Na Rycinie 11 przedstawiono schemat bramkowania komórek w doświadczeniach oceniających przekazywanie Hb.



Rycina 11. Strategia bramkowania komórek po kohodowli. Pierwszy krok stanowiło zabramkowanie komórek na podstawie parametrów rozproszenia czołowego, FSC (ag. *forward scatter*) i rozproszenia bocznego SSC (ang. *side scatter*), oceniających odpowiednio rozmiar i ziarnistość komórek. Następnie oddzielono makrofagi od komórek nowotworowych na podstawie fluorescencji barwnika CellTrace Violet™, którym barwiono komórki nowotworowe. W kolejnym etapie w obu populacjach wyodrębniono komórki pojedyncze (FSC-A/FSC-H), następnie żywe na podstawie fluorescencji barwnika Zombie NIR lub DRAQ7 (barwniki te wnikają do komórek martwych). W tak wyodrębnionej populacji oceniono fluorescencję Hb.

PBMC po inkubacji z Hb-Alexa Fluor™ zgodnie z rozdziałem 3.8, zawieszano w roztworze barwnika pozwalającego ocenić żywotność Zombie NIR™ Fixable Viability Kit (1:400), inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej, po czym płukano PBS (400 rcf, 5 minut, 4°C). Następnie komórki wybarwiono stosując następujące przeciwciała sprzęgnięte z fluorochromami: anty-CD56-PE, anty-CD19-PE-Cy7, anty-CD14-APC i anty-CD3-BD Horizon™ BV421. Komórki inkubowano z przeciwciałami przez 20 min. w temperaturze pokojowej. Po inkubacji komórki przepłukiwano PBS, zawieszano w buforze BD FACSFlow™ i analizowano.

3.11 Mikroskopia konfokalna

Do obrazowania z użyciem mikroskopu konfokalnego komórki wysiewano na 12-mm szkiełka nakrywkowe (Paul Marienfeld) umieszczone w 24-studzienkowej płytce do hodowli komórkowej lub na szkiełka mikroskopowe systemu Lab-Tek™ II (Thermo Scientific). W razie potrzeby, po odpowiednim czasie, komórki utrwalono za pomocą 3,5% paraformaldehydu i barwiono. W kolejnym kroku szkiełka inkubowano w roztworze do permeabilizacji o zawierającym 0,1% saponiny (Sigma), 0,2% żelatyny (Sigma) i 5 mg/ml BSA (SeraCare) w PBS. Następnie szkiełka inkubowano w 40 nM roztworze falloidyny sprzężonej z fluorochromem Atto 390, (Sigma), która barwi aktynę, przez 30 min w temperaturze pokojowej, po czym szkiełka płukano PBS. Szkiełka nakrywkowe przyklejano na szkiełka podstawowe (Paul Marienfeld) przy użyciu odczynnika ProLong™ Gold Antifade Mountant (Life Technologies). Komórki obrazowano za pomocą mikroskopu konfokalnego Leica lub Nikon A1.

3.12 Spektroskopia korelacji fluorescencji

Analiza przy użyciu spektroskopii korelacji fluorescencji (FCS, ang. *fluorescence correlation spectroscopy*) przeprowadzono we współpracy z mgr inż. Anetą Karpińską oraz dr inż. Kariną Kwapiszewską z Zespołu Badawczego Fizykochemii Miękkiej Materii Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk. FCS to metoda służąca do badania cząsteczek fluorescencyjnych w żywych komórkach, polegająca na pomiarze współczynnika dyfuzji. W doświadczeniach użyto modelu lepkości cytoplazmy opracowanego w Instytucie Chemii Fizycznej [155][156]. Na podstawie tego modelu, dla cząsteczki o znanym promieniu hydrodynamicznym, można przewidzieć współczynnik dyfuzji w cytoplazmie komórki. Współczynnik dyfuzji Hb-Alexa Fluor 568 mierzono w roztworach: RPMI-1640 i 0,1 M NaHCO₃. Lepkość RPMI bez surowicy i 0,1 M NaHCO₃ oszacowano na podstawie porównania współczynnika dyfuzji rodaminy B w badanych roztworach i wody. Pomiary dla tetrameru Hb zostały wykonane w RPMI-1640, natomiast dla dimeru i monomeru w 0,1 M NaHCO₃. Otrzymane krzywe autokorelacji dopasowano w model dyfuzji prostej, jednoskładnikowej. Promień hydrodynamiczny obliczono przy użyciu równania Stokes'a-Sutherland's-Einstein'a. Do oceny lepkości komórek MDA-MB-231 wykorzystano koniugaty dextranów z TRITC: TRITC-dex 4,4 kDa oraz TRITC-dex 155 kDa (Sigma-Aldrich). Otrzymane wyniki porównano z krzywą lepkości zależnej od skali otrzymaną eksperymentalnie dla komórek HeLa. Na podstawie uzyskanych

wyników założono, że model otrzymany dla komórek HeLa może mieć zastosowanie dla komórek MDA-MB-231. Współczynniki dyfuzji poszczególnych form Hb-Alexa Fluor 568 obliczono na podstawie opracowanego modelu:

$$\eta_{eff} = \eta_0 A \exp \left[\left(\frac{\xi^2}{R_H} + \frac{\xi^2}{r_p^2} \right)^{-a/2} \right],$$

gdzie:

η_{eff} – efektywna lepkość cytoplazmy;

η_0 – lepkość wody;

A – współczynnik, równy 1.3 ± 0.3 w komórkach HeLa;

ξ – charakterystyczna skala długości, równa 3.16 ± 0.14 w komórkach HeLa;

R_H – charakterystyczna skala długości, równa 12.9 ± 2.3 w komórkach HeLa;

a – wykładnik, równy 0.62 ± 0.07 w komórkach HeLa

r_p – promień hydrodynamiczny próbника.

Analizę FCS w cytoplazmie komórek MDA-MB-231 prowadzono po 4 i 6 godzinach kohodowli z makrofagami THP-1 inkubowanymi uprzednio z Hb-Alexa Fluor 568, zgodnie z opisem w rozdziale 3.9.3. Komórki nowotworowe rozróżniono od makrofagów na podstawie cech morfologicznych: kształtu i adherencji komórek. Pomiarów dyfuzji dokonano w cytoplazmie wrzecionowatych komórek przyklejonych do podłoża. Krzywe autokorelacji FCS uzyskane dla Hb-Alexa Fluor 568 w cytoplazmie MDA-MB-231 zostały dopasowane do dwuskładnikowego modelu normalnej dyfuzji.

Pomiary FCS prowadzono przy użyciu mikroskopu konfokalnego Nikon Eclipse TE2000U w połączeniu z zestawem FCS PicoHarp 300. Pomiary prowadzono w komorze Okolab w temperaturze 36°C.

3.13 Western blot

3.13.1 Przygotowanie próbek

Komórki rozpuszczano w buforze lizującym zawierającym 1% Triton-X100, 10% glicerol, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM HEPES o pH = 7,4 z dodatkiem z inhibitorów proteaz (cOmplete ULTRA Tablets, Roche). Lizę prowadzono przez 30 minut na lodzie, kilkakrotnie mieszając. Następnie próbki były wirowane (16000 rcf, 10 minut, 4°C), po czym supernatant był przenoszony do nowych probówek. Stężenie białka oceniano przy użyciu zestawu PierceTM BCA (Thermo Scientific), który działa na zasadzie redukcji Cu^{2+} do Cu^{1+} przez białka w środowisku alkalicznym, a następnie detekcji kolorymetrycznej kationu miedziawego (Cu^{1+}) za pomocą kwasu bicornoninowego (BCA). Procedurę

wykonano zgodnie z protokołem producenta. W skrócie, do dołka płytki 96-dołkowej dodawano 9 μ l wody, 1 μ l lizatu białkowego i 200 μ l odczynnika roboczego z zestawu, następnie dokładnie mieszano i inkubowano (30 minut, 37°C). Pomiaru absorbancji dokonywano przy długości fali 562 nm za pomocą czytnika Asys UVM340 (Biochrom). Do obliczeń wykorzystywano krzywą wzorcową wykonaną przez oznaczanie stężenia białka w kolejnych rozcieńczeniach BSA. Próbkki zawierające jednakową ilość białka (30 μ g) zawieszano w buforze Laemmli (60 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β -merkaptioetanol, 0,01% błękit bromofenolowy) i gotowano przez 10 minut w temperaturze 95°C.

3.13.2 Elektroforeza białek w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Elektroforezę białek prowadzono w warunkach denaturujących (SDS-PAGE). Używano 4% żelu zagęszczającego i 12% żelu rozdzielającego, przygotowanych zgodnie z Tabelą 4. Próbkki oraz marker mas molekularnych białek PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) załadowano na przygotowany uprzednio żel. Elektroforezę prowadzono w buforze (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicyna, 0,1% SDS, pH ~ 8,3) przy 90 V, po czym po przejściu próbek do żelu rozdzielającego zwiększano napięcie do 120 V.

Tabela 4. Skład żeli poliakrylamidowych.

Odczynnik	Żel zagęszczający 4%	Żel rozdzielający 12%
Woda	1,3 ml	2,6 ml
40% akrylamid/Bis-akrylamid	0,25 ml	3 ml
1 M Tris-HCl pH 8,8 z 0,4% SDS	-	2,5 ml
1 M Tris-HCl pH 6,8 z 0,4% SDS	0,65 ml	-
10% APS	150 μ l	400 μ l
TEMED	5 μ l	10 μ l

3.13.3 Transfer białek na membranę i detekcja białek

Następnie białka przeniesiono z żelu na membranę nitrocelulozową w buforze (25 mM Tris-HCl, 192 mM glicyna, pH ~ 8,3, 20% (v/v) alkohol metylowy) przy 200 mA przez 120 min. W celu zablokowania niespecyficznego wiązania przeciwciał, membranę inkubowano w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w roztworze TBST (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH~7,4, 0,05% (v/v) Tween-20) przez 1 godzinę w temp. pokojowej. W kolejnym etapie membranę inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym

skierowanym przeciwko badanemu białku. Inkubację prowadzono przez 16 godzin w 4°C. Następnie membranę płukano TBST i inkubowano z drugorzędowym przeciwciałem sprzężonym z peroksydazą chrzanową (HRP, *ang. horseradish peroxidase*) skierowanym przeciwko fragmentowi Fc przeciwciała pierwszorzędowego w rozcieńczeniu 1:10000 w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w TBST przez 1 godzinę w temp. pokojowej. Przeciwciała pierwszorzędowe przeciwko podjednostce β Hb (Cell Signaling) przygotowano w rozcieńczeniu 1:1000 w 5% roztworze BSA w TBST, natomiast przeciwciała przeciwko M-Sec przygotowano w rozcieńczeniu 1:1000 w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w TBST. W celu wykrycia aktywności, błonę inkubowano ze sprzężonym z HRP przeciwciałem skierowanym przeciwko β -aktynie (Sigma-Aldrich) w rozcieńczeniu 1:25000 w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w TBST przez 45 min. w temp. pokojowej. Reakcja chemiluminescencyjna została prowadzona przy użyciu substratu SuperSignal™ West Pico PLUS (Thermo Scientific), zgodnie z protokołem producenta. Sygnał chemiluminescencji odczytywano za pomocą ChemiDoc™ Touch Imaging System (Bio-Rad).

3.14 Wyznaczanie poziomu ekspresji genów metodą reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR)

3.14.1 Izolacja całkowitego RNA z komórek

RNA izolowano za pomocą zestawu NucleoSpin® (MACHEREY-NAGEL) zgodnie z protokołem producenta. Stężenie oraz czystość oceniano przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). RNA przechowywano w temperaturze -80°C.

3.14.2 Reakcja odwrotnej transkrypcji

Reakcję odwrotnej transkrypcji wykonywano za pomocą zestawu High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), zgodnie z protokołem producenta. Do reakcji użyto 1 μ g RNA przygotowanego w 10 μ l wody wolnej od nukleaz. Do RNA dodawano mieszaninę reakcyjną składającą się ze starterów, enzymu odwrotnej transkryptazy MultiScribe™, trójfosforanów deoksyrybonukleotydów (dNTP) i buforu. Reakcja odwrotnej transkrypcji była prowadzona w termocyklerze MasterCykler (Eppendorf) i składała się z trzech etapów:

1. 10 min. w temp. 25°C.
2. 120 min. w temp. w 37°C

3. 5 min. w temp. w 85°C.

cDNA otrzymane po reakcji chłodzono do 4°C i przechowywano w temperaturze -20°C.

3.14.3 Reakcja PCR w czasie rzeczywistym

Zbadanie ekspresji genu CD163 oraz genu referencyjnego GAPDH zostało przeprowadzone z wykorzystaniem następujących zestawów TaqMan™ Gene Expression Assays (Applied Biosystems) zawierające parę specyficznych starterów oraz specyficzną sondę fluorescencyjną:

- mysi gen CD163: Mm00474091_m1
- ludzki gen CD163: CD163 Hs00174705_m1
- mysi gen GAPDH: GAPDH Mm99999915_g1
- mysi gen GAPDH: GAPDH Hs02558991_g1.

Do reakcji użyto 5 µl 10-krotnie rozcieńczonego cDNA, 1 µl zestawu ze starterami i sondą, 4 µl wody wolnej od nukleaz oraz 10 µl mieszaniny reakcyjnej TaqMan™ Universal Master Mix II, with UNG (Applied Biosystems), zawierającej polimerazę DNA AmpliTaq Gold®, trójfosforany deoksyrybonukleotydów (dNTP), dUPT, fluorescencyjny barwnik referencyjny, glikozylazę uracylową DNA (UNG, ang. *uracil-DNA glycosylase*) oraz bufor. Reakcja została przygotowana w 96-dółkowej płytce do PCR (Roche), była prowadzona w termocyklerze LightCycler® 480 (Roche). Warunki reakcji przedstawia Tabela 5.

Tabela 5. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

	reakcja PCR			
	inkubacja UNG	aktywacja polimerazy	amplifikacja	
			40 cykli	
			denaturacja	wydłużanie nici DNA
Temperatura [°C]	50	95	95	60
Czas [mm:ss]	2:00	10:00	0:15	1:00

3.15 Analiza statystyczna oraz opracowanie graficzne

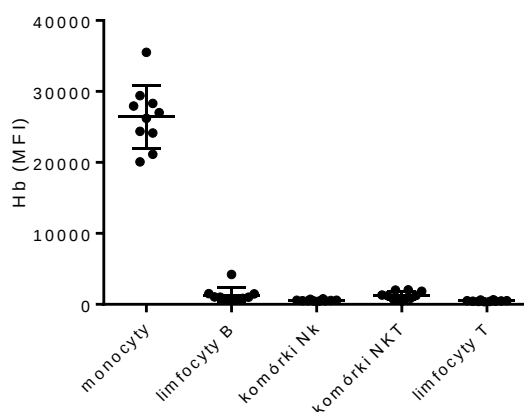
Analizę statystyczną wykonywano w programie GraphPad Prism 7. Stosowano test t-Studenta lub 1-czynnikowym testem ANOVA. Wyniki istotne statystycznie oznaczano gwiazdkami w zależności od wartości p: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001, a brak istotności statystycznej oznaczano „ns”.

Dane liczbowe przedstawiono graficznie za pomocą programu GraphPad Prism 7. Do obróbki graficznej użyto programu Inkscape. Do przygotowania rycin wykorzystywano grafiki Servier Medical Art (smart.servier.com).

4. WYNIKI

4.1 Zbadanie pobierania Hb przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej.

W pierwszym etapie doświadczeń zbadano, które jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC) pobierają Hb. W tym celu, komórki wyizolowane od 10 różnych dawców inkubowano z Hb, a następnie barwiono przeciwciałami monoklonalnymi i analizowano za pomocą cytometrii przepływowej. Wyróżniono 5 populacji komórek: monocyty (CD3-CD14+), limfocyty B (CD3-CD19+), komórki NK (CD3-CD56+), komórki NKT (CD3+CD56+) oraz limfocyty T (CD3+CD56-). Spośród badanych komórek, tylko monocyty pobrały Hb (Ryc. 12). Obserwacje te są zgodne z opisywaną w literaturze funkcją monocytów, które wychwytyują wolną Hb wewnątrznaczyniowo [56].



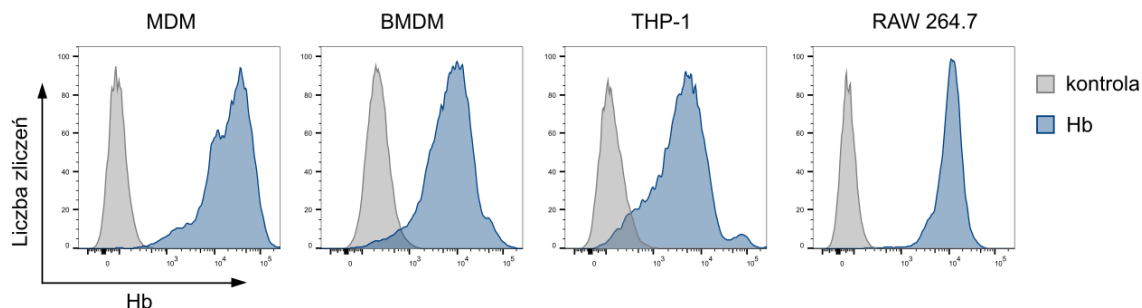
Rycina 12. Pobieranie Hb przez komórki jednojądrzaste krwi obwodowej. Komórki inkubowano w roztworze Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, a następnie zabarwiono barwnikiem oceniającym żywotność oraz przeciwciałami monoklonalnymi (anty-CD3, anty-CD14, anty-CD19, anty-CD56) i analizowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Na wykresie przedstawiono średnią intensywność fluorescencji (MFI) Hb w poszczególnych populacjach komórek. Wyniki przedstawione są jako średnia z 10 donorów $\pm$ SD.

4.2 Zbadanie pobierania Hb przez makrofagi.

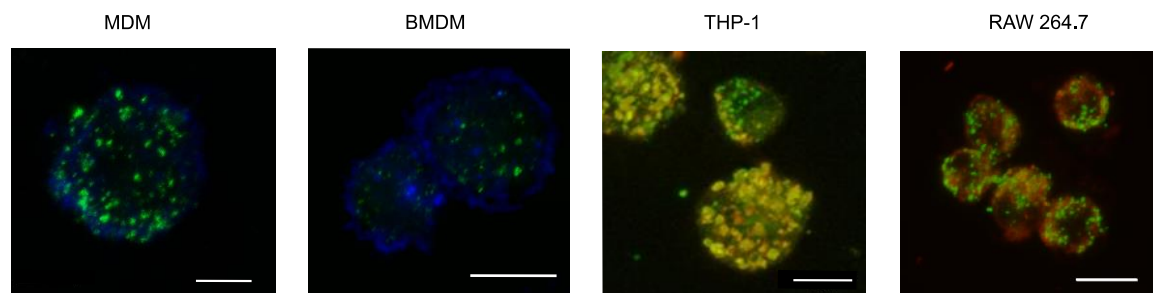
4.2.1 Ocena pobierania Hb przez makrofagi.

W celu zbadania pobierania Hb przez makrofagi, wykorzystano pierwotne makrofagi oraz linie komórkowe: ludzkie makrofagi izolowane z monocytów krwi obwodowej (ang. *monocyte-derived macrophages*, MDM), mysie makrofagi pochodzenia szpikowego (ang. *bone marrow-derived macrophages*, BMDM), makrofagi różnicowane z ludzkiej linii monocytarnej THP-1 oraz komórki mysiej linii makrofagów RAW 264.7. Komórki inkubowano z fluorescencyjnie znakowaną Hb, a następnie odsetek komórek, które pobrały Hb, oceniano przy użyciu cytometrii przepływowej. Analiza wykazała, że wszystkie

badane makrofagi pobierały Hb (Ryc. 13). Komórki po inkubacji z Hb obrazowano również przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Zaobserwowano Hb we wnętrzu komórek, co potwierdziło, że Hb jest pobierana przez badane makrofagi (Ryc. 14).

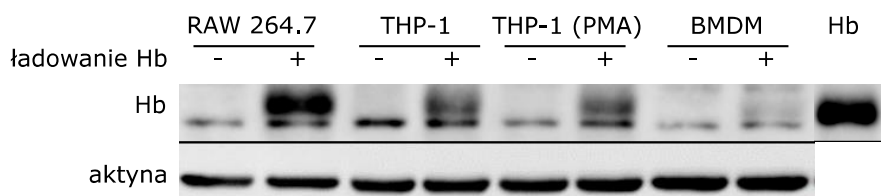


Rycina 13. Pobieranie Hb przez makrofagi ocenione przy użyciu cytometrii przepływowej. Ludzkie makrofagi izolowane z monocytów krwi obwodowej (MDM), mysie makrofagi pochodzenia szpikowego (BMDM), makrofagi różnicowane z ludzkiej linii monocytarnej THP-1 oraz komórki mysiej linii makrofagów RAW 264.7 inkubowano w roztworze Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, a następnie oceniano przy użyciu cytometrii przepływowej. Na wykresie przedstawiono przykładowe histogramy przedstawiające zmianę fluorescencji komórek po pobraniu Hb-AF488.



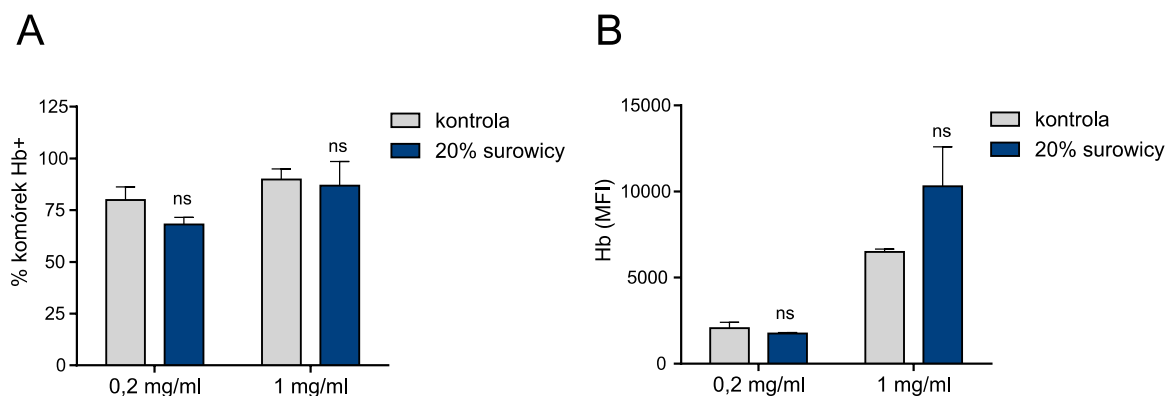
Rycina 14. Pobieranie Hb przez makrofagi ocenione przy użyciu mikroskopii konfokalnej. Ludzkie makrofagi izolowane z monocytów krwi obwodowej (MDM), mysie makrofagi pochodzenia szpikowego (BMDM), makrofagi różnicowane z ludzkiej linii monocytarnej THP-1 oraz komórki mysiej linii makrofagów RAW 264.7 inkubowano w roztworze Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, a następnie barwiono i obrazowano przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Na rycinie przedstawiono przykładowe obrazy w uwidocznieniu Hb-AF488 (kolor zielony) oraz aktyny (kolor niebieski) lub błon komórkowych (kolor czerwony). Skala przedstawia 10 μm.

Dodatkowo, za pomocą techniki Western blot przeanalizowano lizaty komórkowe otrzymane po inkubacji wybranych komórek z Hb. W komórkach mysiej linii makrofagów RAW 264.7, komórkach linii monocytarnej THP-1, makrofagach różnicowanych z linii THP-1 oraz mysich makrofagach pochodzenia szpikowego zobrazowano prążek opowiadający Hb (Ryc. 15). Powyższe wyniki świadczą o pobieraniu Hb przez makrofagi.



Rycina 15. Pobieranie Hb przez monocyty i makrofagi ocenione przy użyciu techniki Western blot. Komórki mysiej linii makrofagów RAW 264.7, komórki linii monocytarnej THP-1, makrofagi różnicowane z linii THP-1 oraz mysie makrofagi pochodzenia szpikowego inkubowano w roztworze Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, po czym przeprowadzono analizę Western blot na lizatach komórkowych. Na rycinie przedstawiono prążek opowiadający Hb oraz prążek odpowiadający aktynie (kontrola ilości nakładanego białka).

Wolna Hb w surowicy jest wiązana przez Hp i kompleks Hb-Hp jest wychwytywany przez receptor CD163 na monocytach/makrofagach [44]. W dotychczas opisanych doświadczeniach, Hb pobierana przez komórki znajdowała się w roztworze pożywki hodowlanej bez dodatku surowicy. W kolejnym etapie doświadczeń zbadano, czy dodanie ludzkiej surowicy jako potencjalnego źródła Hp, spowoduje zwiększenie pobierania Hb przez makrofagi różnicowane z linii THP-1. Dodanie 20% ludzkiej surowicy do roztworu Hb nie wpłynęło istotnie na pobieranie Hb przez makrofagi: nie zmienił się odsetek komórek pobierających Hb (Ryc. 16A) oraz nie zmieniła się średnia fluorescencja Hb w komórkach (Ryc. 16B) w obu badanych stężeniach Hb.



Rycina 16. Wpływ ludzkiej surowicy na pobieranie Hb przez makrofagi. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano w roztworze Hb-AF488 o stężeniu 0,2 mg/ml lub 1 mg/ml z dodatkiem 20% ludzkiej surowicy lub w medium bez surowicy przez 1 godzinę, a następnie analizowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Wykresy przedstawiają odsetek komórek, które pobrały Hb (A) oraz średnią fluorescencję Hb (MFI) w makrofagach (B). Wyniki przedstawione są jako średnia niezależnych prób $\pm$ SD (n=2). Ns-zmiana nieistotna statystycznie (test t-Studenta).

W celu zbadania znaczenia receptora CD163 w pobieraniu Hb sprawdzono ekspresję mRNA dla CD163 w komórkach linii monocytarnej THP-1 oraz makrofagach przy użyciu reakcji odwrotnej transkrypcji i techniki real-time PCR. Wartości C_p 35 świadczą o niskiej ekspresji danego mRNA. Tylko makrofagi różnicowane z linii THP-1 oraz ludzkie makrofagi różnicowane z monocytów krwi (MDM) wykazywały ekspresję

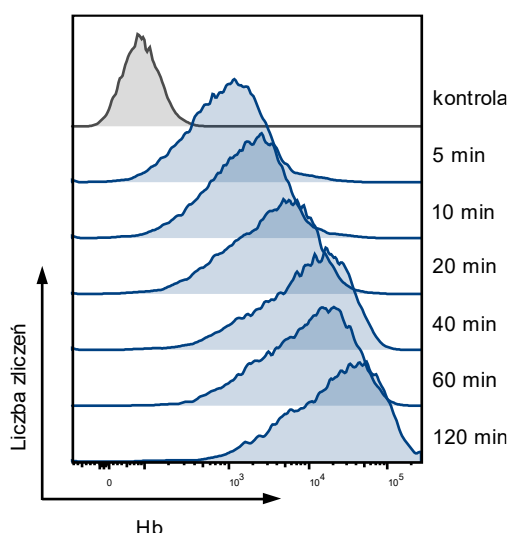
CD163 na poziomie mRNA (Tabela 6). Natomiast pozostałe badane komórki (THP-1, RAW 264.7 oraz BMDM) miały wartość C_p 35 dla CD163 lub wykazywały brak amplifikacji dla CD163 przy amplifikacji genu referencyjnego GAPDH ($C_p \sim 20$). Powyższe wyniki sugerują, że pobieranie Hb przez makrofagi może być niezależne od Hp i CD163.

Tabela 6. Zbadanie ekspresji CD163 na poziomie mRNA w wybranych komórkach. Wyniki przedstawiają wartość punktu przecięcia krzywej amplifikacji produktu PCR (crossing point, C_p) dla CD163 oraz GAPDH (gen kontrolny). Wyniki przedstawione są jako średnia z niezależnych prób ($n=2$). Wynik reprezentatywny z dwóch eksperymentów.

Komórki	Średnia wartość C_p	
	CD163	GAPDH
THP-1	35	19,97
Makrofagi różnicowane z THP-1	25,44	19,14
MDM	26,02	20,73
RAW 264.7	brak amplifikacji	18,61
BMDM	35	20,18

4.2.2 Ocena pobierania Hb przez makrofagi w czasie.

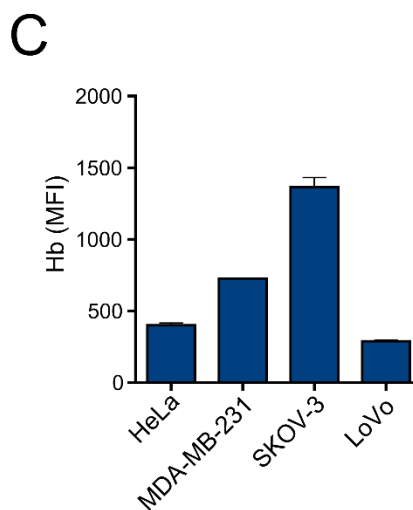
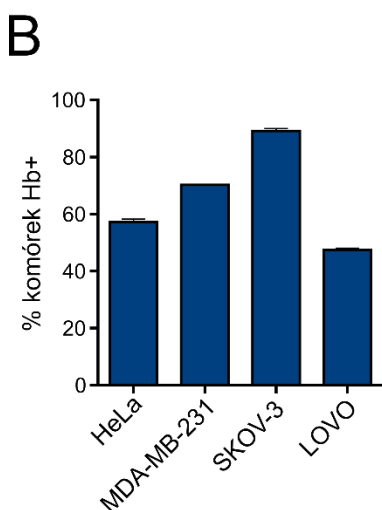
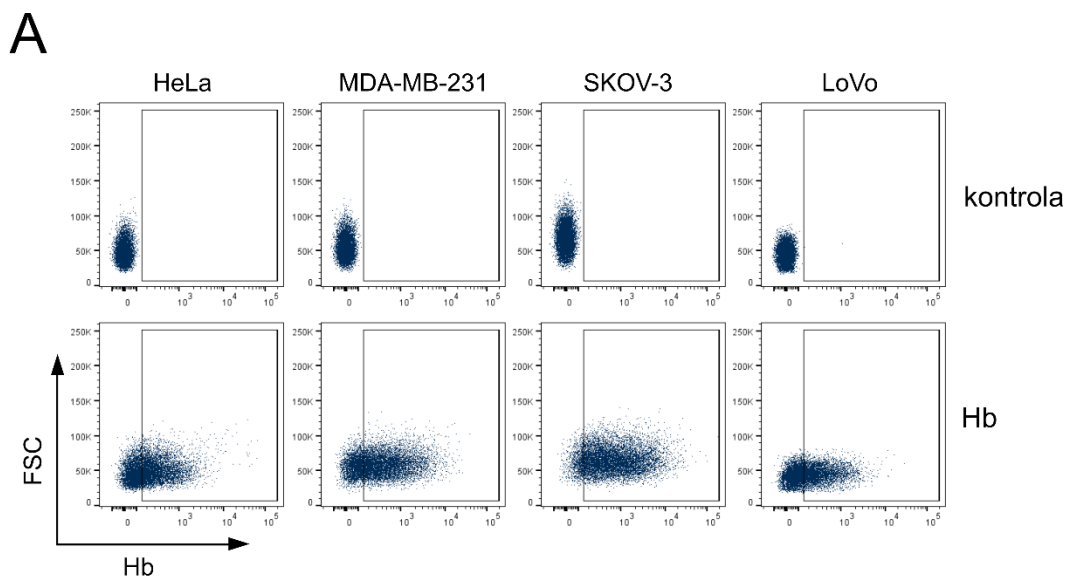
W kolejnym doświadczeniu sprawdzono pobieranie Hb w czasie. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano z roztworem 1 mg/ml Hb przez 5, 10, 20, 40, 60 oraz 120 min, a następnie analizowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Zaobserwowano wzrost fluorescencji Hb w makrofagach wraz z wydłużeniem czasu inkubacji z Hb (Ryc. 17).



Rycina 17. Pobieranie Hb przez makrofagi w czasie. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano w roztworze Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 5, 10, 20, 40, 60 oraz 120 min, a następnie analizowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Na wykresie przedstawiono przykładowe histogramy przedstawiające zmianę fluorescencji komórek po pobraniu Hb-AF488.

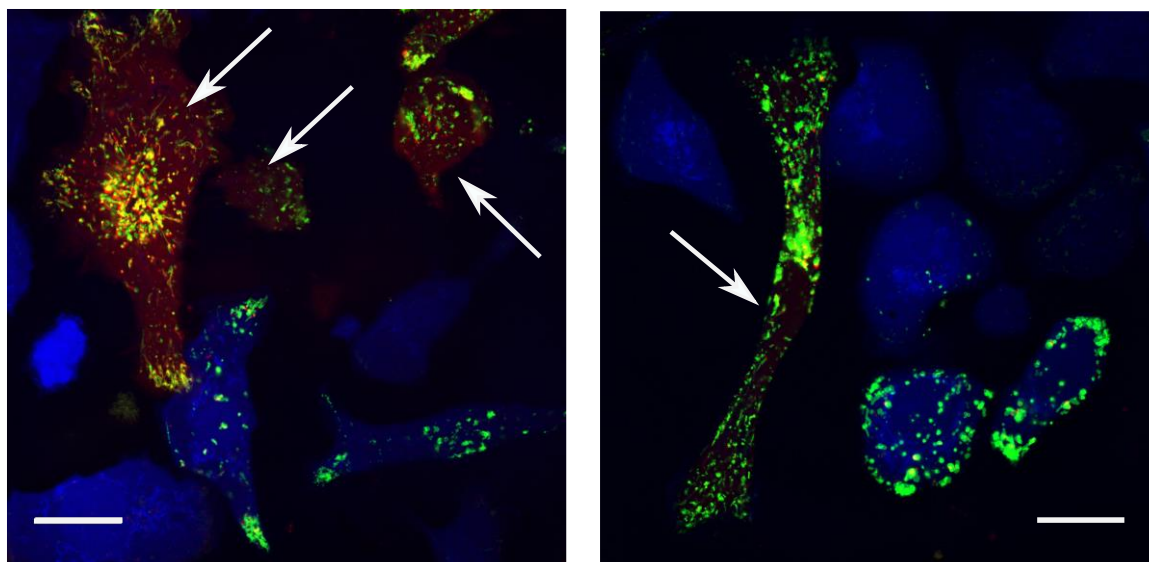
4.3 Zbadanie przekazywania Hb z makrofagów do komórek nowotworowych.

W kolejnym etapie przeprowadzono kohodowlę makrofagów inkubowanych z Hb z komórkami nowotworowymi. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano z Hb, a następnie wysiewano z komórkami nowotworowymi w stosunku 2:1. Przeprowadzono kohodowlę makrofagów z 4 liniami nowotworowymi: HeLa, MDA-MB-231, SKOV-3 oraz LoVo. Komórki nowotworowe były uprzednio wybarwione związkiem fluorescencyjnym, co umożliwiło rozróżnienie dwóch populacji w analizie cytometrycznej. Zbadano, czy Hb jest obecna w komórkach nowotworowych po 24-godzinnej kohodowli. Analiza cytometryczna wykazała zmianę fluorescencji komórek nowotworowych w kanale dla Hb-AF488 (Ryc. 18A), co świadczy o transferze Hb z makrofagów do komórek nowotworowych. Transfer Hb z makrofagów zaobserwowano we wszystkich badanych liniach nowotworowych. Efektywność transferu Hb przedstawiono jako odsetek komórek nowotworowych pozytywnych dla Hb (Ryc. 18B) oraz średnią intensywność fluorescencji (MFI) Hb (Ryc. 18C). Wartości te były najwyższe w wypadku linii SKOV-3, co sugeruje, że transfer Hb z makrofagów jest najefektywniejszy w wypadku tej linii.



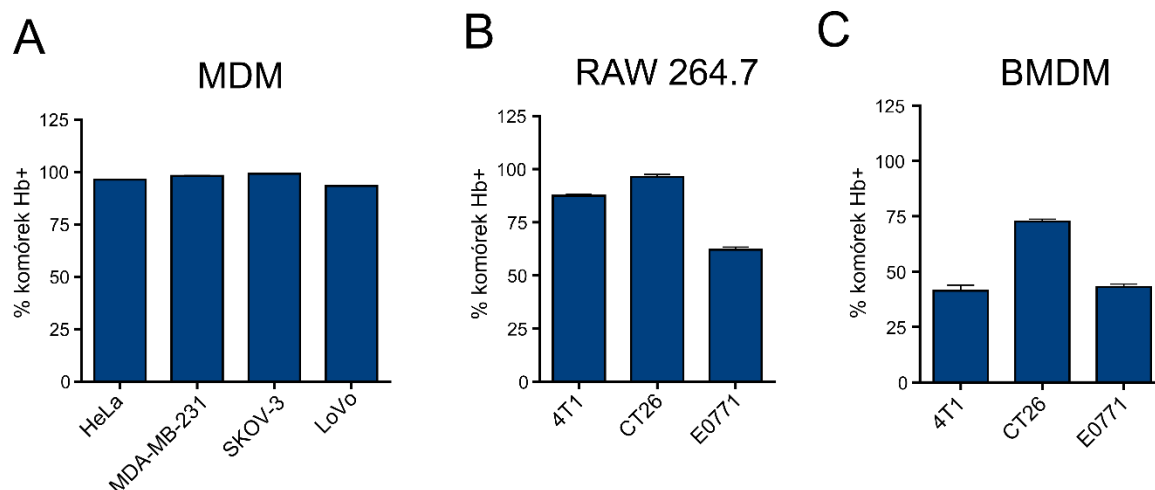
Rycina 18. Transfer Hb z makrofagów różnicowanych z linii THP-1 do komórek nowotworowych oceniony przy użyciu cytometrii przepływowej. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano w roztworze Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, kohodowano z komórkami nowotworowymi (HeLa, MDA-MB-231, SKOV-3, LoVo) przez 24 godziny, a następnie analizowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Na rycinie pokazano przykładowe wykresy kropkowe przedstawiające zmianę fluorescencji Hb w komórkach nowotworowych (A), odsetek komórek nowotworowych pozytywnych dla Hb (B) oraz średnią intensywność fluorescencji (MFI) Hb w komórkach nowotworowych. B, C. Wyniki przedstawione są jako średnia z niezależnych prób $\pm$ SD (n=2). Wynik reprezentatywny z trzech eksperymentów.

Makrofagi i komórki nowotworowe kohodowane przez 24 godziny obrazowano również z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej. W komórkach nowotworowych (czerwona fluorescencja) zaobserwowano sygnał pochodzący od Hb (zielona fluorescencja), co potwierdza transfer Hb z makrofagów (niebieska fluorescencja) (Ryc. 19).



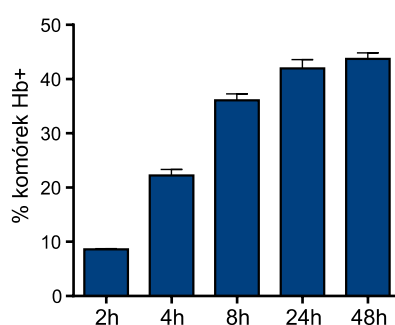
Rycina 19. Transfer Hb z makrofagów różnicowanych z linii THP-1 do komórek nowotworowych oceniony przy użyciu mikroskopii konfokalnej. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano w roztworze Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, kohodowano z komórkami nowotworowymi (SKOV-3) przez 24 godziny a następnie obrazowano w przy użyciu mikroskopii konfokalnej. Kolor zielony-Hb, kolor czerwony-SKOV-3, kolor niebieski-makrofagi. Strzałki wskazują przykładowe komórki nowotworowe, które pobrały Hb pochodzącą od makrofagów. Skala przedstawia 10 μ m.

W kolejnym etapie sprawdzono, czy transfer Hb do komórek nowotworowych zachodzi również z innych makrofagów niż zbadane do tej pory makrofagi różnicowane z linii THP-1. W tym celu przeprowadzono kohodowle ludzkich makrofagów różnicowanych z monocytów krwi z komórkami linii nowotworowych: HeLa, MDA-MB-231, SKOV-3 oraz LoVo, a także kohodowle komórek RAW 264.7 lub mysich makrofagów pochodzenia szpikowego z mysimi liniami nowotworowymi: 4T1, CT26 oraz E0771. Analiza cytometryczna wykazała, że transfer Hb zachodzi we wszystkich zbadanych układach, z ludzkich makrofagów różnicowanych z monocytów krwi (Ryc. 20A), komórek RAW 264.7 (Ryc. 20B) oraz mysich makrofagów pochodzenia szpikowego (Ryc. 20C).



Rycina 20. Transfer Hb z ludzkich makrofagów różnicowanych z monocytów krwi, komórek RAW 264.7 oraz mysich makrofagów pochodzenia szpikowego do komórek nowotworowych oceniony przy użyciu cytometrii przepływowej. Makrofagi inkubowano w roztworze Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, kohodowano z komórkami nowotworowymi przez 24 godziny, a następnie analizowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Na wykresie przedstawiono odsetek komórek nowotworowych pozytywnych dla Hb po kohodowli z makrofagami różnicowanymi z monocytów krwi, MDM (A), komórek RAW 264.7 (B) oraz mysich makrofagów pochodzenia szpikowego, BMDM (C). Wyniki przedstawione są jako średnia z niezależnych prób $\pm$ SD. A. n=2; B, C. n=3. B, C-wyniki reprezentatywne z dwóch eksperymentów.

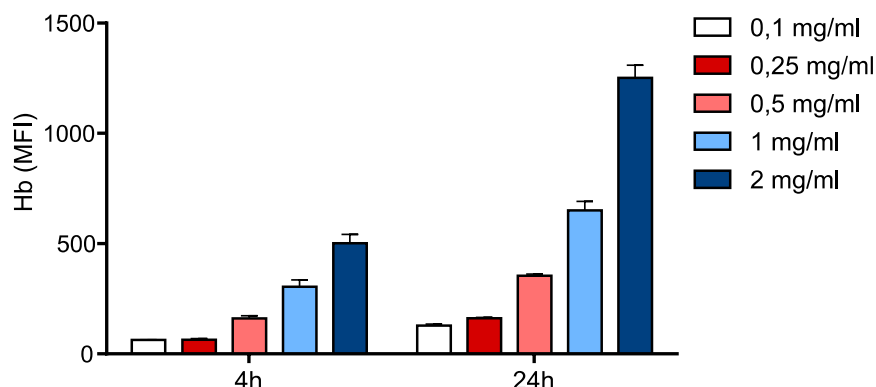
Aby ocenić dynamikę transferu Hb w czasie, przeprowadzano kohodowle makrofagów różnicowanych z linii THP-1 i komórek nowotworowych o różnym czasie trwania: 2, 4, 8, 24 i 48 godzin. Odsetek komórek nowotworowych pozytywnych dla Hb rósł stopniowo wraz z wydłużeniem czasu kohodowli (Ryc. 21).



Rycina 21. Dynamika transferu Hb w czasie. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano w roztworze Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, kohodowano z komórkami nowotworowymi SKOV-3 przez 2, 4, 8, 24 i 48 godzin, a następnie analizowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Na wykresie przedstawiono odsetek komórek nowotworowych pozytywnych dla Hb. Wyniki przedstawione są jako średnia z niezależnych prób $\pm$ SD (n=3). Wynik reprezentatywny z dwóch eksperymentów.

W kolejnym doświadczeniu zbadano zależność transferu Hb od stężenia Hb podanej makrofagom. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano w roztworach Hb o stężeniach: 0,1; 0,25; 0,5; 1 i 2 mg/ml przez 1 godzinę, a następnie kohodowano z komórkami nowotworowymi przez 4 lub 24 godziny. Efektywność transferu Hb określona na podstawie średniej wartości fluorescencji (MFI) Hb w komórkach

nowotworowych rosła stopniowo wraz ze wzrostem stężenia Hb w obu badanych czasach kohodowli (Ryc. 22).



Rycina 22. Transfer Hb w zależności od stężenia Hb podanej makrofagom. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano w roztworach Hb-AF488 stężeniach: 0,1; 0,25; 0,5; 1 i 2 mg/ml przez 1 godzinę, kohodowano z komórkami nowotworowymi MDA-MB-231 przez 4 lub 24 godziny, a następnie analizowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Na wykresie przedstawiono średnią intensywność fluorescencji (MFI) Hb w komórkach nowotworowych. Wyniki przedstawione są jako średnia z niezależnych prób $\pm$ SD (n=3).

4.3.1 Zbadanie przekazywania Hb przy użyciu spektroskopii korelacji fluorescencji

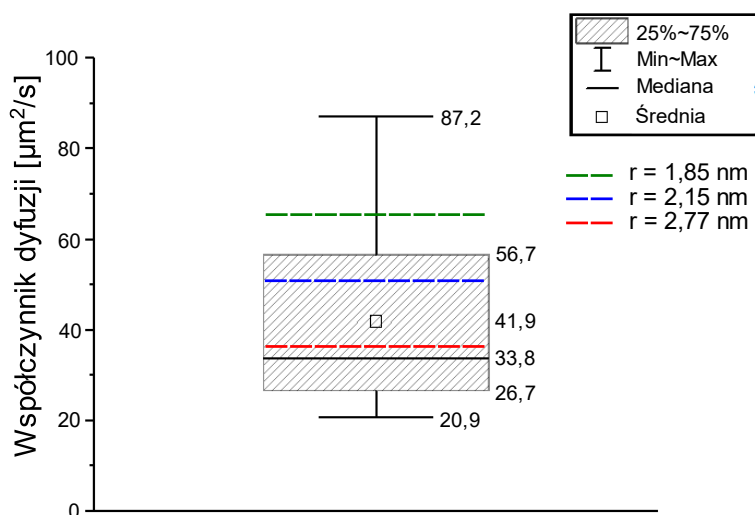
W celu lepszego zrozumienia procesu przekazywania Hb wykorzystano spektroskopię korelacji fluorescencji (ang. *fluorescence correlation spectroscopy*, FCS). W pierwszym etapie dokonano analizy Hb-AF568 w roztworze. Wyliczono promień hydrodynamiczny dla monomeru, dimeru i tetramery Hb, otrzymano odpowiednio 1,85 nm, 2,15 nm i 2,77 nm (Tab. 7). Następnie obliczono przewidywane współczynniki dyfuzji dla Hb w roztworze wodnym oraz w cytoplazmie komórek MDA-MB-231 (Tab. 7). W kolejnym doświadczeniu dokonano pomiarów fluktuacji fluorescencji w cytoplazmie komórek MDA-MB-231 po kohodowli z makrofagami inkubowanymi uprzednio z Hb-AF568. Dopiero po upływie 6 godzin od rozpoczęcia kohodowli udało się uzyskać odpowiednią do dalszych pomiarów krzywą autokorelacji FCS. Krzywe autokorelacji FCS dopasowano za pomocą dwuskładnikowego modelu normalnej dyfuzji.

Tabela 7. Przewidywane współczynniki dyfuzji dla Hb-AF568 w temperaturze 36° C.

Hb	tetramer	dimer	Monomer
r_p [nm]	2,77	2,15	1,85
D_{aq} [$\mu m^2/s$]*	116	149	173
D_{cyto} [$\mu m^2/s$]	$35,9 \pm 2,1$	$52,5 \pm 2,9$	$65,3 \pm 3,6$

Analiza wykazała, że współczynniki dyfuzji wykrytych składników były niejednorodne i odpowiadały monomerom, dimerom, tetramerom oraz większym oligomerom obecnym w cytoplazmie (Ryc. 23). Uzyskana wartość mediany odpowiada

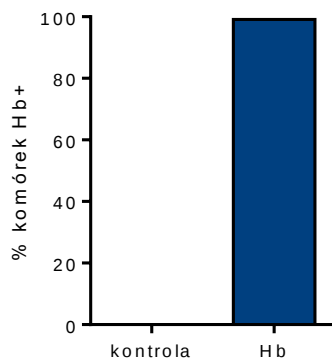
promieniowi tetrameru Hb uzyskanemu w roztworze, co sugeruje, że tetramer jest dominującą formą Hb w cytoplazmie MDA-MB-231 po kohodowli. Zaobserwowaliśmy także składnik o niskim współczynniku dyfuzji i dużej zmienności w zakresie od $3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ do $0,0001 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Wartości te są charakterystyczne dla współczynnika dyfuzji małych struktur błonowych, takich jak pęcherzyki wewnątrzkomorowe, co świadczy o wiązaniu Hb z błonami pęcherzyków. Podsumowując, metoda FCS potwierdziła transfer Hb z makrofagów do komórek MDA-MB-231. Ponadto, stwierdzono obecność Hb w strukturach pęcherzykowych oraz wykazano, że główną formą obecną w komórkach nowotworowych po transferze jest tetramer Hb.



Rycina 23. Rozkład średnich współczynników dyfuzji dla szybszego składnika Hb-AF568 w cytoplazmie komórek MDA-MB-231. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano w roztworze Hb-AF568 przez 1 godzinę, kohodowano z komórkami MDA-MB-231 przez 6 godzin, a następnie analizowano z wykorzystaniem spektroskopii korelacji fluorescencji. Na wykresie zaznaczono kolorowymi liniami przerywanymi przewidywane współczynniki dyfuzji dla różnych form Hb.

4.4 Zbadanie przekazywania Hb z makrofagów do makrofagów.

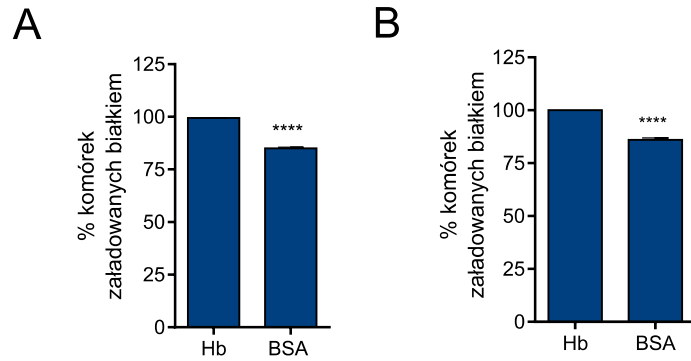
W następnym etapie przeprowadzono kohodowlę makrofagów inkubowanych z Hb („dawcy”) z makrofagami nieinkubowanymi z Hb („biorcy”), które były uprzednio zabarwione fluorescencyjnie w celu rozróżnienia tych dwóch populacji makrofagów podczas analizy cytometrycznej. Odsetek makrofagów „biorców” pozytywnych dla Hb osiągnął 100% po kohodowli (Ryc. 24), co świadczy o transferze Hb między makrofagami.



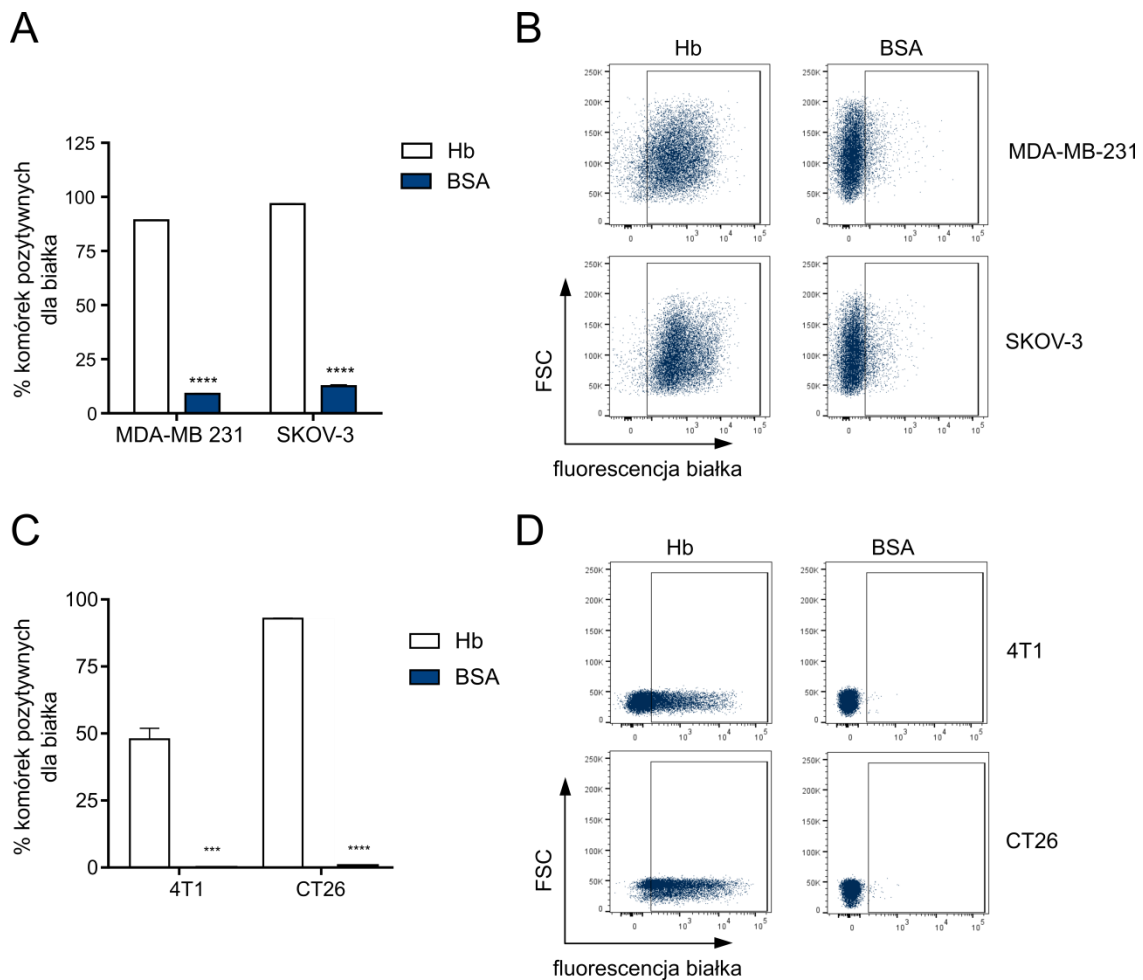
Rycina 24. Transfer Hb z makrofagów do makrofagów. Mysie makrofagi pochodzenia szpikowego („dawcy”) inkubowano w roztworze Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, z uprzednio zabawionymi fluorescencyjnie makrofagami pochodzenia szpikowego („biorcy”) przez 24 godziny, a następnie analizowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Na wykresie przedstawiono odsetek mysich makrofagów (biorców) pozytywnych dla Hb. Wyniki przedstawione są jako średnia z niezależnych prób $\pm$ SD (n=2-3).

4.5 Zbadanie pobierania BSA przez makrofagi i przekazywania BSA z makrofagów do komórek nowotworowych.

Kolejne doświadczenia miały na celu sprawdzenie czy transfer Hb jest procesem unikatowym dla tego białka. Zbadano, czy inne białko - BSA będzie pobierane przez makrofagi i przekazywane komórkom nowotworowym. W tym celu inkubowano makrofagi w roztworze Hb lub BSA o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, a następnie kohodowano z komórkami nowotworowymi przez 24 godziny, po czym przeprowadzono analizę z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Zarówno makrofagi różnicowane z linii THP-1 (Ryc. 25A), jak i komórki RAW 264.7 (Ryc. 25B) efektywnie pobrały BSA w odsetku zbliżonym do 85%. Analiza komórek nowotworowych po kohodowli wykazała, że w przeciwieństwie do transferu Hb, transfer BSA zachodzi w bardzo małym stopniu (transfer z makrofagów różnicowanych z linii THP-1, Ryc. 26A-B) lub nie zachodzi wcale (transfer z RAW 264.7, Ryc. 26C-D).



Rycina 25. Pobieranie BSA przez makrofagi. Makrofagi inkubowano z w roztworze Hb-AF488 lub BSA-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, kohodowano z komórkami nowotworowymi przez 24 godziny, a następnie analizowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Wykresy przedstawiają odsetek makrofagów różnicowanych z linii THP-1 (A) oraz komórek RAW 264.7 (B), które pobrały Hb lub BSA. Wyniki przedstawione są jako średnia z niezależnych prób $\pm$ SD (n=6). **** p<0.0001 (test t-Studenta).

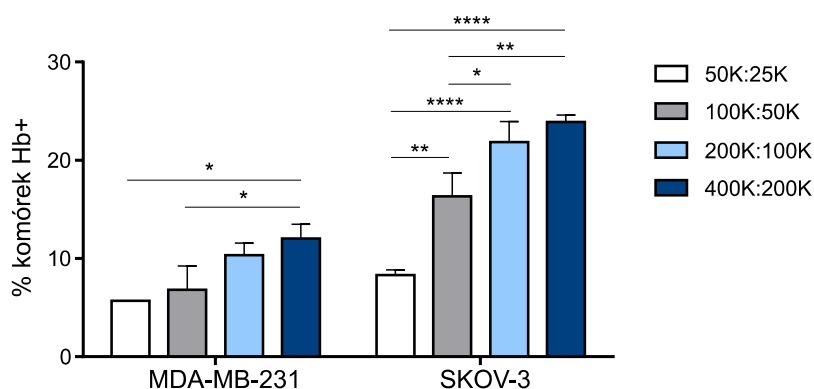


Rycina 26. Transfer BSA z makrofagów do komórek nowotworowych. Makrofagi inkubowano w roztworze Hb-AF488 lub BSA-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, kohodowano z komórkami nowotworowymi przez 24 godziny, a następnie analizowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Na wykresach przedstawiono odsetek komórek nowotworowych pozytywnych dla Hb lub BSA po kohodowli z makrofagami różnicowanymi z linii THP-1 (A) lub komórkami RAW 264.7 (C). Wyniki przedstawione są jako średnia z niezależnych prób $\pm$ SD (n=3). Wynik reprezentatywny z dwóch eksperymentów. *** p<0.001, **** p<0.0001 (test t-Studenta). B, D. Przykładowe wykresy kropkowe pokazujące zmianę fluorescencji Hb lub BSA w komórkach nowotworowych po kohodowli z makrofagami różnicowanymi z linii THP-1 (B) lub komórkami RAW 264.7 (D).

4.6 Zbadanie mechanizmu przekazywania Hb z makrofagów do komórek nowotworowych

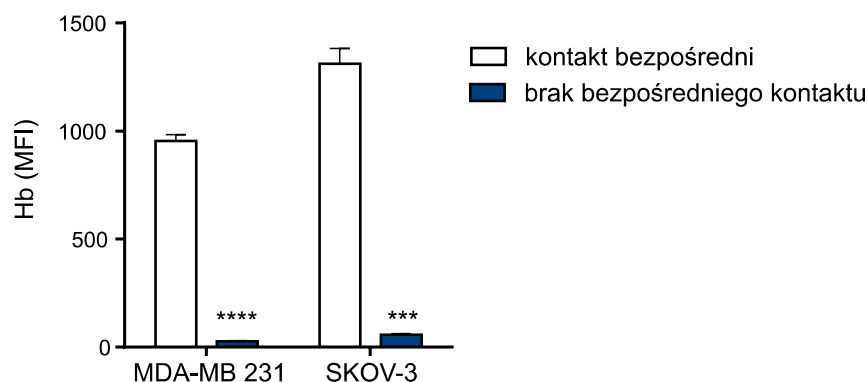
4.6.1 Zbadanie wpływu bezpośredniego kontaktu między komórkami na przekazywanie Hb

W następnym etapie zbadano jaki mechanizm jest odpowiedzialny za transfer Hb z makrofagów do komórek nowotworowych. Doświadczenia rozpoczęto od sprawdzenia znaczenia bezpośredniego kontaktu między komórkami. Przeprowadzono krótką (4 godziny) kohodowlę makrofagów różnicowanych z linii THP-1, inkubowanych uprzednio z Hb, z komórkami nowotworowymi linii MDA-MB-231 oraz SKOV-3 w różnej gęstości komórek. Analiza cytometryczna wykazała, że im większa gęstość komórek, tym większy odsetek komórek nowotworowych pozytywnych dla Hb (Ryc. 27).



Rycina 27. Wpływ gęstości komórek w kohodowli na przekazywanie Hb. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano w roztworze Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, kohodowano z komórkami nowotworowymi (MDA-MB-231, SKOV-3) przez 4 godziny, a następnie analizowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Komórki były wysiewane w ilościach podanych na wykresie, w proporcji 2:1 (makrofagi : komórki nowotworowe). Na wykresie przedstawiono odsetek komórek nowotworowych pozytywnych dla Hb. Wyniki przedstawione są jako średnia z niezależnych prób $\pm$ SD (n=2-3). *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001 (1-czynnikowa ANOVA z korektą Tukey'a).

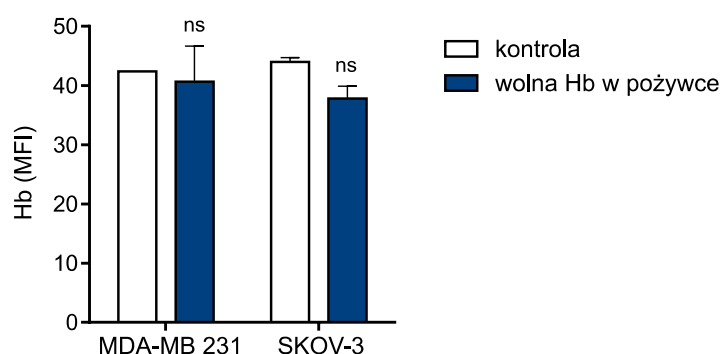
W następnym doświadczeniu komórki do kohodowli wysiewano z zachowaniem bezpośredniego kontaktu lub na płytce ze specjalnym filtrem-membraną z porami o średnicy 1 μ m, która uniemożliwia bezpośredni kontakt między komórkami, ale pozwala na wymianę medium hodowlanego (Ryc. 10B). Brak bezpośredniego kontaktu niemal zupełnie zahamował przekazywanie Hb z makrofagów różnicowanych z linii THP-1 do obu badanych linii nowotworowych: MDA-MB-231 oraz SKOV-3 (Ryc. 28). Wyniki te sugerują, że bliski kontakt między makrofagami a komórkami nowotworowymi wpływa istotnie na efektywność transferu Hb.



Rycina 28. Wpływ bezpośredniego kontaktu na przekazywanie Hb. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano w roztworze Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, kohodowano z komórkami nowotworowymi (MDA-MB-231, SKOV-3) przez 24 godziny, a następnie analizowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Komórki były wysiewane standardowo (kontakt bezpośredni), lub na płytce Transwell® (brak bezpośredniego kontaktu). Na wykresie przedstawiono średnią intensywność fluorescencji (MFI) Hb w komórkach nowotworowych. Wyniki przedstawione są jako średnia z niezależnych prób $\pm$ SD (n=2-3). *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (test t-Studenta).

4.6.2 Zbadanie wpływu blokowania potencjalnego receptora dla Hb na komórkach nowotworowych na przekazywanie Hb.

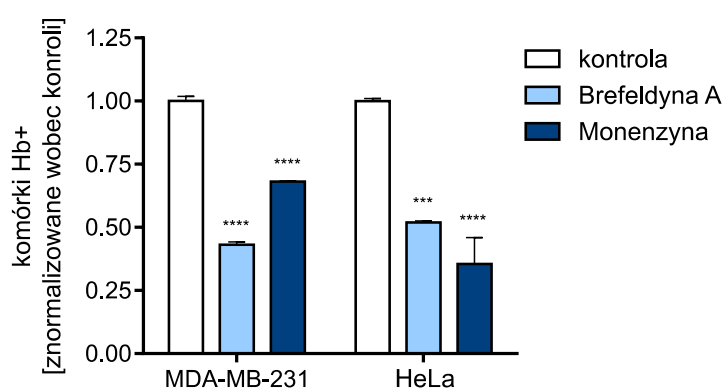
Aby zbadać znaczenie potencjalnego receptora dla Hb na komórkach nowotworowych w procesie przekazywania Hb, prowadzono kohodowlę w obecności wolnej, nieznakowanej Hb, co miało na celu wysycenie tego receptora. Zaobserwowano, że obecność wolnej Hb w medium podczas kohodowli nie wpłynęła na efektywność transferu Hb, ocenionej na podstawie średniej fluorescencji (MFI) Hb w komórkach nowotworowych (Ryc. 29).



Rycina 29. Wpływ blokowania potencjalnego receptora dla Hb na komórkach nowotworowych na przekazywanie Hb. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano w roztworze Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, kohodowano z komórkami nowotworowymi (MDA-MB-231, SKOV-3) przez 4 godziny w standardowym medium lub medium z dodatkiem 1 mg/ml nieznakowanej Hb, a następnie analizowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Na wykresie przedstawiono średnią intensywność fluorescencji (MFI) Hb w komórkach nowotworowych. Wyniki przedstawione są jako średnia z niezależnych prób $\pm$ SD (n=2-3). Wynik reprezentatywny z dwóch eksperymentów. Ns-zmiana nieistotna statystycznie (test t-Studenta).

4.6.3 Zbadanie wpływu blokowania wewnątrzkomórkowego transportu białek na przekazywanie Hb.

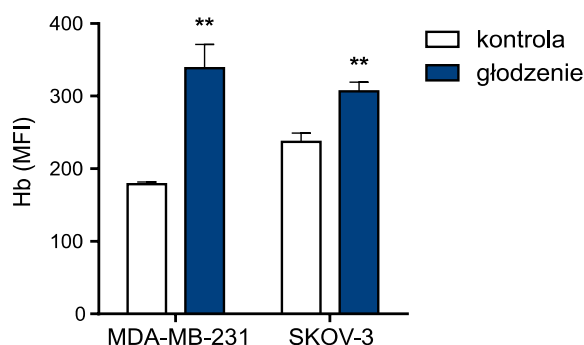
Analiza przekazywania Hb z wykorzystaniem spektroskopii korelacji fluorescencji sugerowała lokalizację Hb w pęcherzykach wewnątrzkomórkowych. Do zbadania roli wewnątrzkomórkowego transportu błonowego w przekazywaniu Hb, wykorzystano monenzynę oraz brefeldynę A, które hamują odpowiednio degradację w lizosomach i transport białek z siateczki śródplazmatycznej do aparatu Golgiego. Wykazano, że przekazywanie Hb podczas kohodowli prowadzonej w obecności brefeldyny A lub monenzyny jest znacząco zmniejszone (Ryc. 30).



Rycina 30. Wpływ blokowania wewnątrzkomórkowego transportu białek na przekazywanie Hb. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano w roztworze Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, kohodowano z komórkami nowotworowymi (MDA-MB-231, HeLa) przez 4 godziny w medium z dodatkiem brefeldyny A lub monenzyny, a następnie analizowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Na wykresie przedstawiono odsetek komórek nowotworowych pozytywnych dla Hb, znormalizowany wobec kontroli. Wyniki przedstawione są jako średnia z niezależnych prób $\pm$ SD (n=2-3). Wynik reprezentatywny z dwóch eksperymentów. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (1-czynnikowa ANOVA korektą Dunnetta).

4.6.4 Zbadanie wpływu głodzenia na przekazywanie Hb.

W kolejnym etapie przeprowadzono kohodowlę makrofagów, inkubowanych uprzednio z Hb, z komórkami nowotworowymi w pożywce hodowlanej bez surowicy, po czym dokonano analizy cytometrycznej. W warunkach obniżonej zawartości surowicy (głodzenie), zaobserwowano zwiększony transfer Hb do obu badanych linii nowotworowych (Ryc. 31).

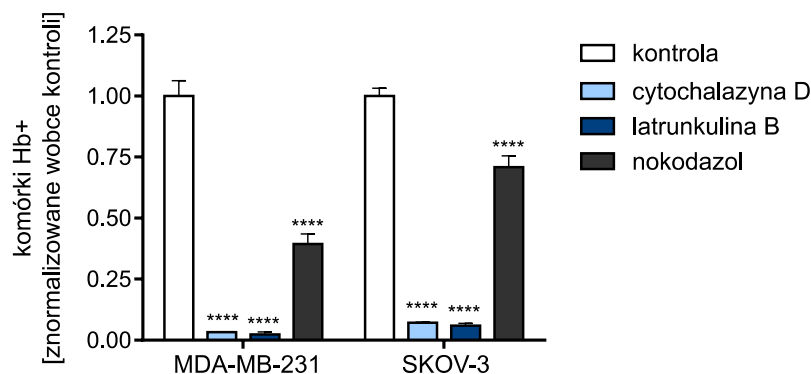


Rycina 31. Wpływ głodzenia komórek na przekazywanie Hb. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano w roztworze Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, kohodowano z komórkami nowotworowymi (MDA-MB-231, SKOV-3) przez 24 godziny w standardowym medium (kontrola) lub medium bez dodatku surowicy (głodzenie), a następnie analizowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Na wykresie przedstawiono średnią intensywność fluorescencji (MFI) Hb w komórkach nowotworowych. Wyniki przedstawione są jako średnia z niezależnych prób $\pm$ SD (n=3). ** $p < 0.01$ (test t-Studenta).

4.6.5 Zbadanie roli cytoszkieletu na przekazywanie Hb.

4.6.5.1 Zbadanie wpływu hamowania polimeryzacji aktyny i polimeryzacji mikrotubul na przekazywanie Hb.

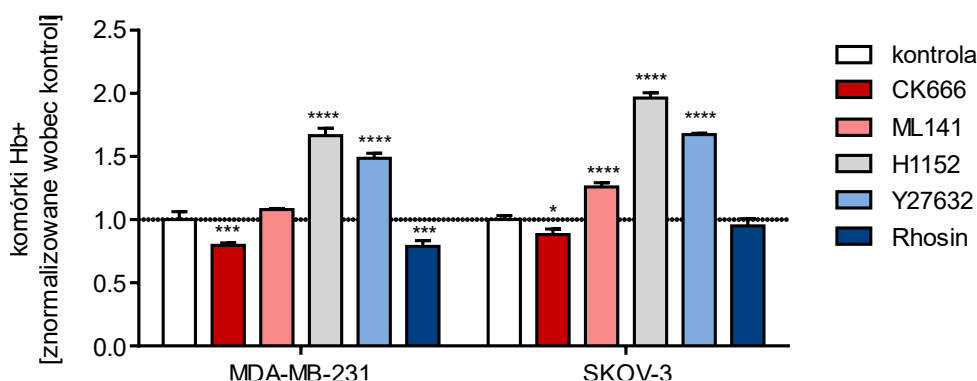
W następnych doświadczeniach zbadano rolę aktyny i mikrotubul w mechanizmie przekazywania Hb. W tym celu wykorzystano dwa inhibitory polimeryzacji aktyny (cytochazyna D, latrunkulina) oraz jeden inhibitor polimeryzacji mikrotubul (nokodazol). Przeprowadzono kohodowle makrofagów, inkubowanych uprzednio z Hb, z komórkami nowotworowymi w obecności wymienionych wyżej inhibitorów, a następnie dokonano analizy komórek z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Wykazano, że zahamowanie polimeryzacji aktyny podczas kohodowli niemal całkowicie zablokowało przekazywanie Hb w wypadku obu badanych inhibitorów: cytochalzyny D i latrunkuliny i dwóch linii komórek nowotworowych (Ryc. 32). Zastosowanie inhibitora polimeryzacji mikrotubul, nokodazolu, zmniejszyło przekazywanie Hb z makrofagów do komórek MDA-MB-231 o około 50%, a do komórek SKOV-3 o około 25% (Ryc. 32).



Rycina 32. Wpływ blokowania polimeryzacji aktyny i mikrotubul na przekazywanie Hb. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano w roztworze Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, kohodowano z komórkami nowotworowymi (MDA-MB-231, SKOV-3) przez 4 godziny w medium z dodatkiem cytochalazyny D (2 μ M), latrunkuliny B (1 μ M) lub nokodazolu (2 μ M), a następnie analizowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Na wykresie przedstawiono odsetek komórek nowotworowych pozytywnych dla Hb, znormalizowany wobec kontroli. Wyniki przedstawione są jako średnia z niezależnych prób $\pm$ SD (n=2-3). Wynik reprezentatywny z dwóch eksperymentów. *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ (1-czynnikowa ANOVA korektą Dunnetta).

4.6.5.2 Zbadanie wpływu hamowania wybranych mediatorów polimeryzacji aktyny.

Aktyna jest zaangażowana w wiele procesów komórkowych. Aby lepiej zrozumieć rolę cytoszkieletu aktynowego w procesie przekazywania Hb, zbadano wpływ wybranych mediatorów polimeryzacji aktyny. Przeprowadzono kohodowle makrofagów, inkubowanych uprzednio z Hb, z komórkami nowotworowymi w obecności wybranych inhibitorów szlaków polimeryzacji aktyny, a następnie komórki analizowano przy użyciu cytometrii przepływowej. Zahamowanie Arp2/3, białka biorącego udział w nukleacji aktyny, umiarkowanie zmniejszyło transfer Hb do obu badanych linii nowotworowych (Ryc. 33). Do zablokowania działania GTPazy Cdc42 wykorzystano inhibitor ML141. Zahamowanie GTPazy Cdc42, której aktywacja prowadzi do tworzenia filopodiów, nie wpłynęło na przekazywanie Hb z makrofagów do komórek linii MDA-MB-231, natomiast zwiększyło przekazywanie Hb z makrofagów do komórek linii SKOV-3 (Ryc. 33). Transfer Hb z makrofagów do komórek nowotworowych obu linii nowotworowych został znacząco zwiększony w obecności dwóch badanych inhibitorów Rho-zależnej kinazy (ROCK, ang. *Rho-associated protein kinase*), H1152 oraz Y27632 (Ryc. 33). Obecność inhibitora Rho, Rhosin, podczas kohodowli, nieznacznie zmniejszyła transfer Hb do komórek MDA-MB-231, natomiast nie wpłynęła na transfer do komórek SKOV-3 (Ryc. 33).

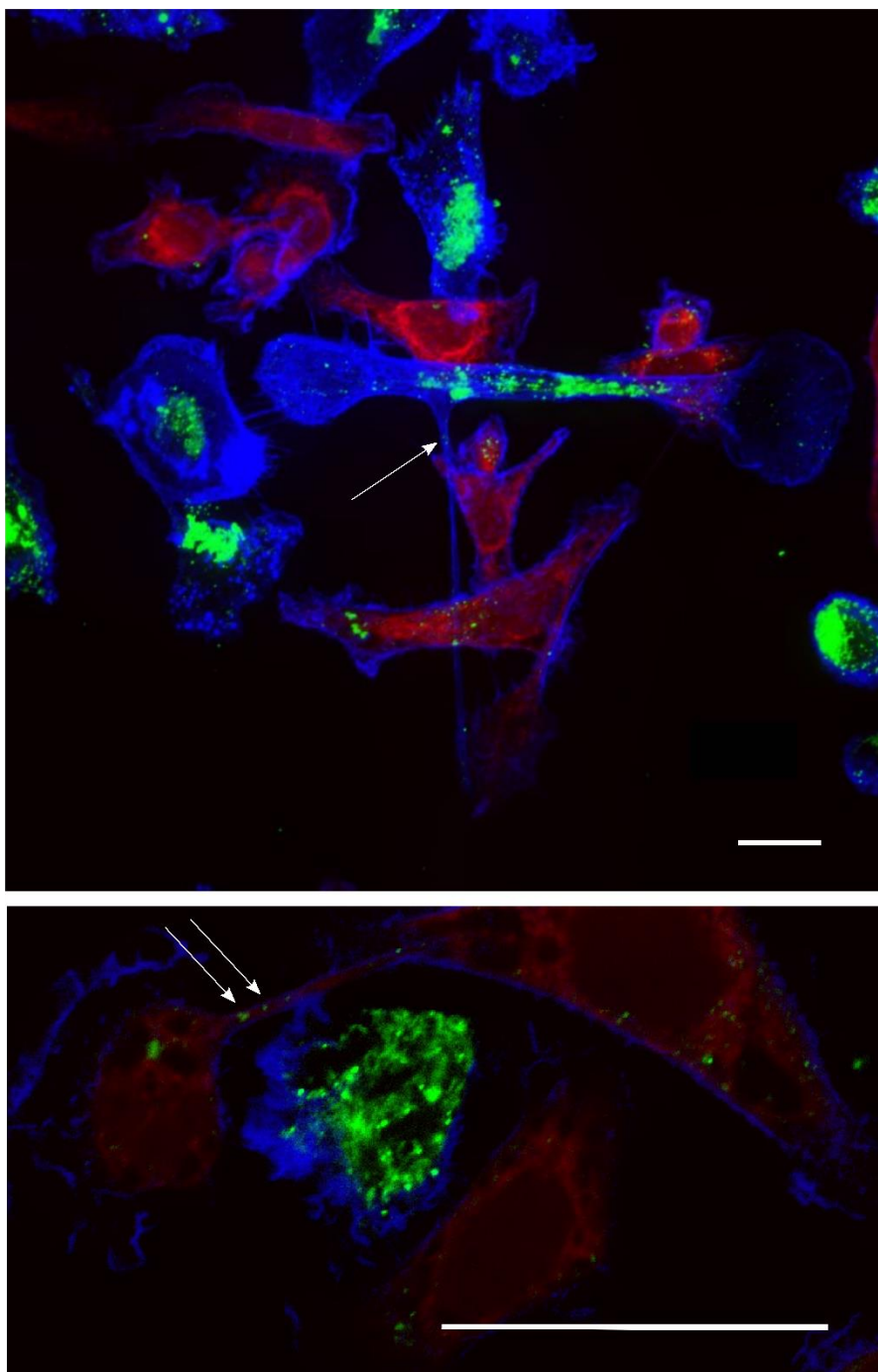


Rycina 33. Wpływ blokowania wybranych mediatorów polimeryzacji aktyny na przekazywanie Hb. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano w roztworze Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, kohodowano z komórkami nowotworowymi (MDA-MB-231, SKOV-3) przez 4 godziny w medium z dodatkiem CK666 (40 μ M), ML141 (10 μ M), H1152 (20 μ M), Y27632 (10 μ M) lub Rhosin (30 μ M), a następnie analizowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Na wykresie przedstawiono odsetek komórek nowotworowych pozytywnych dla Hb, znormalizowany wobec kontroli. Wyniki przedstawione są jako średnia z niezależnych prób $\pm$ SD (n=2-3). Wynik reprezentatywny z dwóch eksperymentów. *p<0.05, *** p<0.001, **** p<0.0001 (1-czynnikowa ANOVA korektą Dunnetta).

4.6.6 Zbadanie roli TNT w przekazywaniu Hb.

4.6.6.1 Ocena występowania Hb w TNT między makrofagami a komórkami nowotworowymi.

Jednym z sposobów komunikacji międzykomórkowej, w którym aktyna odgrywa istotną rolę, jest tworzenie nanorurek tunelowych (ang. *tunneling nanotubes*, TNT) [157]. W celu zbadania tworzenia się TNT pomiędzy makrofagami a komórkami nowotworowymi, dokonano obrazowania komórek po 24 godzinach kohodowli za pomocą mikroskopii konfokalnej. Za pomocą barwnika falloidyny uwidoczono aktynę. W kohodowli zaobserwowano połączenia o cechach TNTs między makrofagami THP-1 a komórkami nowotworowymi: połączenia bogate w aktynę i nie przylegające całkowicie do podłoża. Cechy te są zgodne z definicją określoną przez Dupont *et al.*, TNT łączą co najmniej dwie komórki, zawierają aktynę i nie dotykają podłoża [90]. Obrazowanie wykazało, że Hb występowała w tych połączeniach między komórkami, lecz rzadko (Ryc. 34). Warto zaznaczyć, że połączenia TNT są wrażliwe na czynniki chemiczne [76], dlatego procedura przygotowania komórek (utrwalenie) mogła uszkodzić część połączeń.

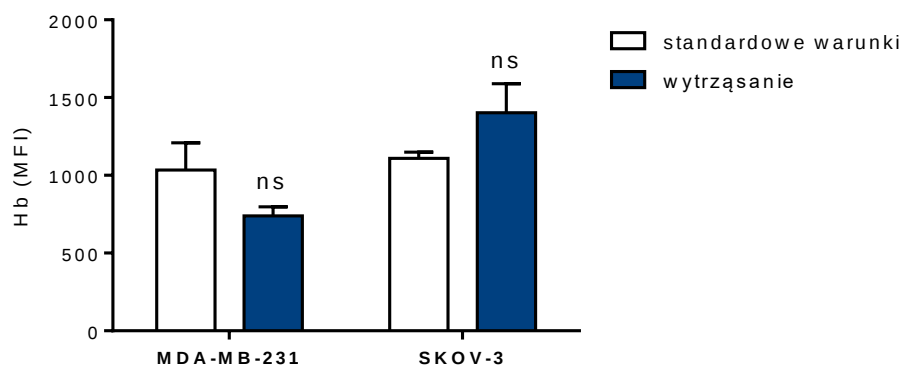


Rycina 34. Ocena występowania Hb w połączeniach komórkowych. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano w roztworze Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, kohodowano z komórkami nowotworowymi (SKOV-3) przez 24 godziny, a następnie obrazowano w przy użyciu mikroskopii konfokalnej. Kolor zielony-Hb, kolor czerwony-SKOV-3, kolor niebieski-aktyna. Strzałkami oznaczono Hb w połączeniach typu TNT. Skala przedstawia 20 μ m.

4.6.6.2 Zbadanie wpływu mechanicznego uszkodzenia TNT na przekazywanie Hb.

Z powodu wrażliwości TNT na mechaniczne uszkodzenia, tworzenie TNT jest zaburzone podczas hodowli prowadzonych w warunkach delikatnego wytrząsania [83][158][159]. W celu zbadania wpływu mechanicznego uszkodzenia TNT na przekazywanie Hb,

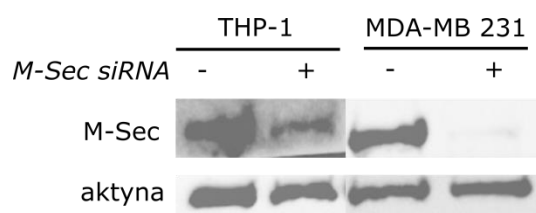
porównano efektywność przekazywania Hb w kohodowli przeprowadzanej w warunkach delikatnego wytrząsania z kohodowlą prowadzoną w warunkach standardowych (statycznych). Analiza cytometryczna wykazała, że mechaniczne uszkodzenie TNT nie wpływa w sposób istotny statystycznie na efektywność przekazywania Hb z makrofagów do komórek nowotworowych. Wynik przedstawiono jako porównanie względnej, średniej fluorescencji Hb w komórkach nowotworowych (Ryc. 35).



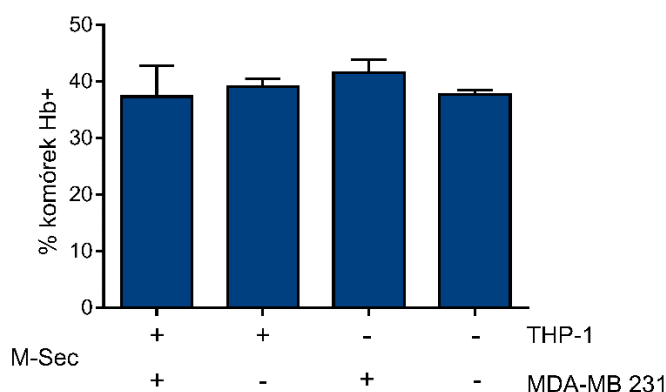
Rycina 35. Wpływ mechanicznego uszkodzenia TNT (wytrząsanie) na przekazywanie Hb. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano w roztworze Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, kohodowano z komórkami nowotworowymi (MDA-MB-231, SKOV-3) przez 24 godziny w standardowych warunkach lub z wytrząsaniem (250 rpm). Na wykresie przedstawiono średnią intensywność fluorescencji (MFI) Hb w komórkach nowotworowych. Wyniki przedstawione są jako średnia z niezależnych prób $\pm$ SD (n=3). Ns-zmiana nieistotna statystycznie (test t-Studenta).

4.6.6.3 Zbadanie wpływu wyciszenia białka M-Sec na przekazywanie Hb.

Białko M-Sec zostało opisane w literaturze jako regulator powstawania TNT w makrofagach [94] oraz komórkach nowotworowych [160][161]. W celu zbadania znaczenia białka M-Sec w przekazywaniu Hb, obniżono ilość mRNA kodującego M-Sec w makrofagach oraz komórkach nowotworowych za pomocą siRNA. Przy użyciu metody Western blot oceniono, że wprowadzenie do komórek swoistych cząsteczek siRNA spowodowało znaczące zmniejszenie ilości M-Sec w makrofagach oraz niemal całkowity brak M-Sec w komórkach nowotworowych (Ryc. 36). Komórki ze zmniejszoną ilością M-Sec wykorzystano w kohodowli i zbadano przekazywanie Hb. Zaobserwowano, że zmniejszenie ilości M-Sec, zarówno w makrofagach, jak i w komórkach nowotworowych nie ma wpływu na przekazywanie Hb (Ryc. 37).



Rycina 36. Ocena ilości białka M-Sec w komórkach techniką Western blot. Lizaty białkowe makrofagów różnicowanych z linii THP-1 oraz komórek MDA-MB-231 traktowanych siRNA swoistym wobec M-Sec oraz siRNA kontrolnym. Na rycinie przedstawiono prążek opowiadający M-Sec oraz prążek odpowiadający aktynie (kontrola ilości nakładanego białka).

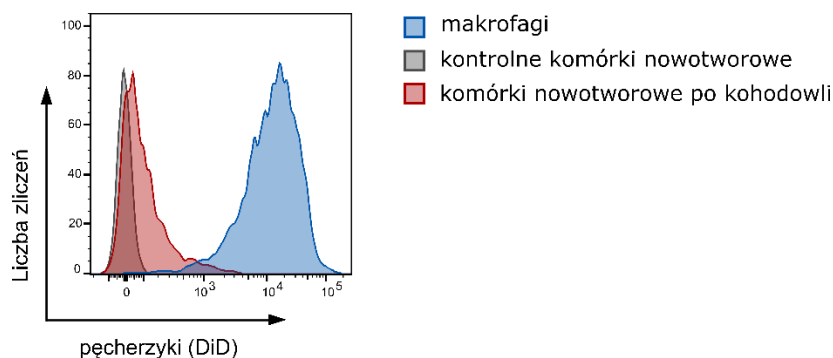


Rycina 37. Wpływ zmniejszenia ilości białka M-Sec na przekazywanie Hb. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano w roztworze Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, kohodowano z komórkami nowotworowymi (MDA-MB-231) przez 24 godziny, a następnie analizowano przy użyciu cytometrii przepływowej. Na wykresie przedstawiono odsetek komórek nowotworowych pozytywnych dla Hb. Wyniki przedstawione są jako średnia z niezależnych prób $\pm$ SD (n=2). Brak istotności statystycznej między grupami otrzymano wykorzystując 1-czynnikowy test ANOVA z korektą Tukey'a.

4.6.7 Zbadanie roli wewnątrzkomórkowych pęcherzyków w przekazywaniu Hb.

4.6.7.1 Ocena przekazywania pęcherzyków wewnątrzkomórkowych między makrofagami a komórkami nowotworowymi.

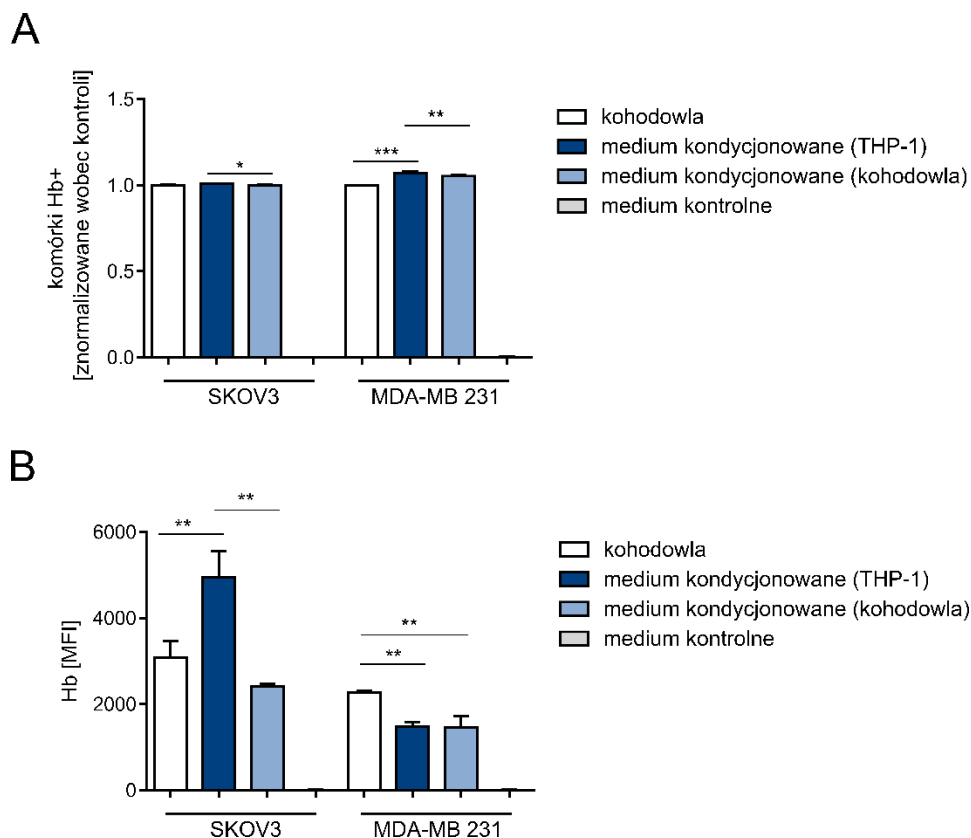
W celu zbadania przekazywania pęcherzyków wewnątrzkomórkowych z makrofagów do komórek nowotworowych per se, wykorzystaliśmy lipofilny barwnik DiD, który jest wykorzystywany do śledzenia transportu błon i pęcherzyków [87]. Makrofagi różnicowane z linii THP-1, zabarwione barwnikiem DiD kohodowano z komórkami nowotworowymi przez 4h, a następnie dokonano analizy w wykorzystaniu cytometrii przepływowej. W komórkach nowotworowych zaobserwowano sygnał fluorescencyjny DiD (Ryc. 38), co sugeruje transfer pęcherzyków wewnątrzkomórkowych z makrofagów do komórek nowotworowych.



Rycina 38. Ocena przekazywania pęcherzyków wewnątrzkomórkowych z makrofagów do komórek nowotworowych. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 zabarwiono przy użyciu DiD, kohodowano z komórkami nowotworowymi (SKOV-3) przez 4 godziny, a następnie analizowano z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Na wykresie przedstawiono przykładowe histogramy przedstawiające zmianę fluorescencji komórek w kanale dla DiD.

4.6.7.2 Zbadanie pobierania Hb z medium kondycjonowanego.

W kolejnym etapie zbadano, czy Hb jest wydzielana przez makrofagi do pożywki, a następnie pobierana przez komórki nowotworowe. W tym celu zebrano pożywkę znad 24-godzinnej hodowli makrofagów inkubowanych z Hb, a następnie dodawano ją do uprzednio wysianych komórek nowotworowych na kolejne 24 godziny, po czym komórki nowotworowe analizowano przy użyciu cytometru przepływowego. Pobieranie przez komórki nowotworowe Hb wydzielonej z makrofagów porównywano z przekazywaniem Hb w kohodowli. Dodatkowo, zebrano medium znad kohodowli makrofagów inkubowanych z Hb i komórek nowotworowych, po czym dodawano na 24 godziny do komórek nowotworowych. Zaobserwowano, że odsetek komórek nowotworowych pozytywnych dla Hb był taki sam w wypadku Hb pobranej z medium kondycjonowanego jak w kohodowli i wynosił 100% (Ryc. 39). Średnia fluorescencja Hb w komórkach nowotworowych SKOV-3 inkubowanych z medium kondycjonowanym znad makrofagów była wyższa niż komórek nowotworowych po kohodowli i po inkubacji z medium znad kohodowli (Ryc. 39). W wypadku komórek MDA-MB-231, średnia fluorescencja Hb była najwyższa po kohodowli z komórkami inkubowanymi z Hb (Ryc. 39).

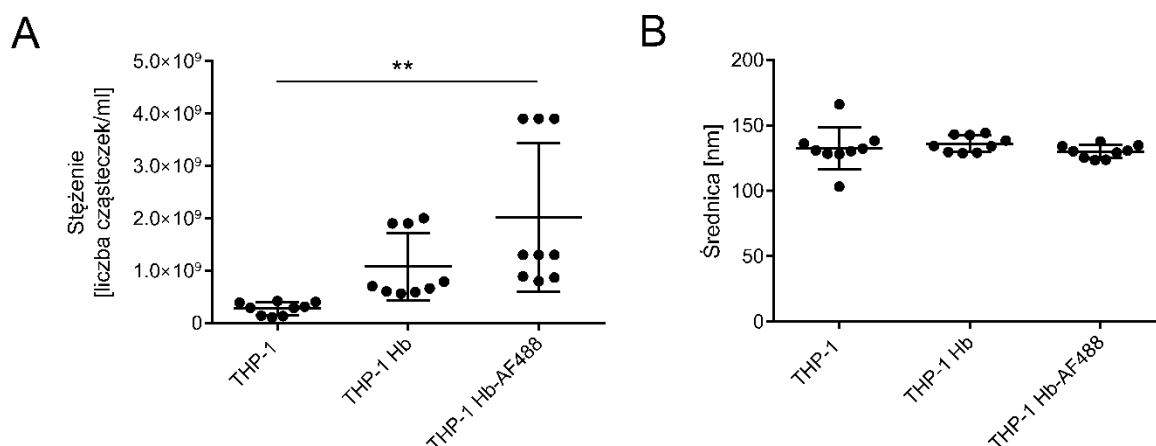


Rycina 39. Ocena pobierania Hb z medium kondycjonowanego. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano w roztworze Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, po czym hodowano jako hodowlę samych makrofagów lub kohodowlę z komórkami nowotworowymi (SKOV-3 lub MDA-MB-231). Po 24 godzinach medium znad hodowli zbierano i transferowano do uprzednio wysianych komórek nowotworowych na 24 godziny. Komórki poddano analizie przy użyciu cytometrii przepływowej. Na wykresie przedstawiono odsetek komórek nowotworowych pozytywnych dla Hb (A) i średnią intensywność fluorescencji (MFI) Hb w komórkach nowotworowych (B). Wyniki przedstawione są jako średnia z niezależnych prób $\pm$ SD ($n=2-3$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ (1-czynnikowy test ANOVA z korektą Tukey'a).

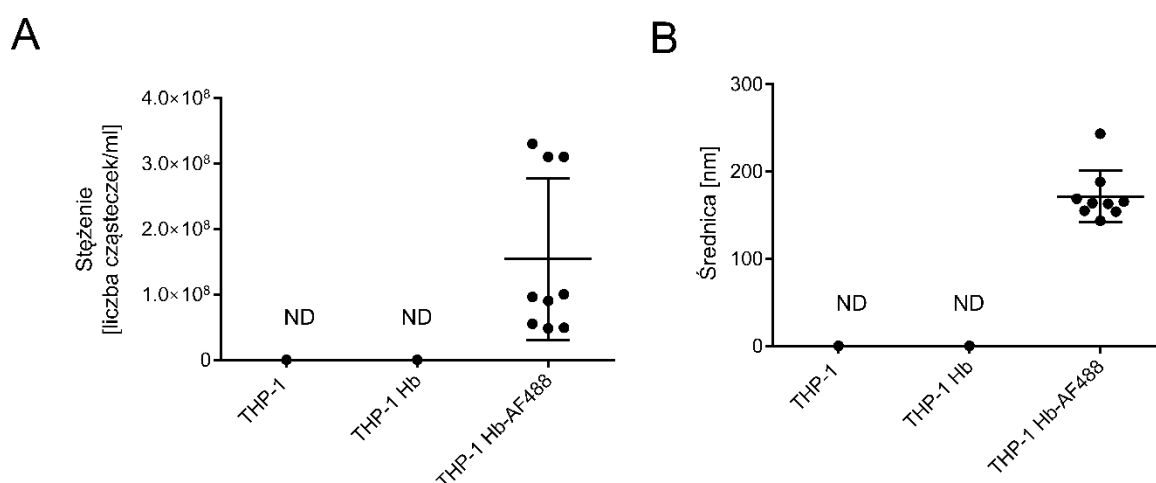
4.6.7.3 Izolacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z medium kondycjonowanego.

Aby sprawdzić, czy Hb jest wydzielana przez makrofagi w formie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, dokonano izolacji frakcji EVs z pożywki zebranej znad 24-godzinnej hodowli makrofagów inkubowanych uprzednio z Hb-AF488. Dodatkowo izolowano EVs z pożywki znad makrofagów kontrolnych oraz makrofagów inkubowanych z nieznakowaną Hb. Wyizolowane frakcje pęcherzyków poddano analizie NTA. Wykazano, że w medium znad makrofagów inkubowanych z Hb-AF488 stężenie EVs wynosi średnio $2,02 \times 10^9$ /ml, natomiast w pożywce znad makrofagów kontrolnych $2,76 \times 10^8$ /ml, a wypadku makrofagów inkubowanych z nieznakowaną Hb $1,08 \times 10^8$ /ml (Ryc. 40A). Podczas analizy NTA wykazano, że średnica EVs wynosi 130 nm, 136 nm oraz 128,1 nm w pożywce zbieranej znad odpowiednio: makrofagów inkubowanych z Hb-AF488, nieznakowaną Hb oraz makrofagów kontrolnych (Ryc. 40B). Następnie, na podstawie fluorescencji oceniono stężenie EVs zawierających Hb. Tylko w pożywce

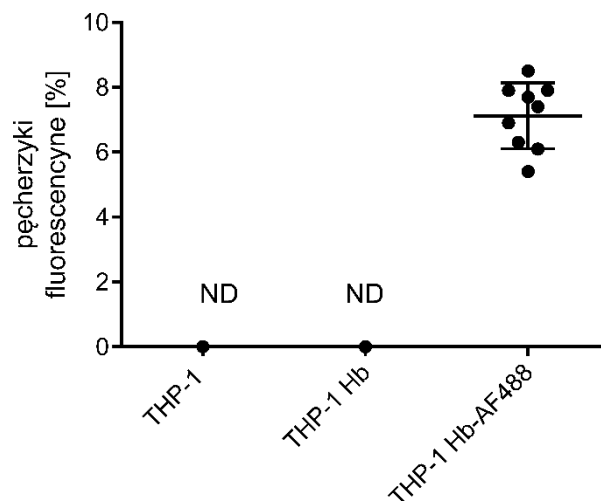
znad makrofagów inkubowanych z Hb-AF488 występowały pęcherzyki z fluorescencyjną Hb. Ich stężenie wynosiło Hb 1.54×10^8 pęcherzyków/ml (Ryc. 41A), natomiast ich średnica to średnio 171,5 nm (Ryc. 41B). Pęcherzyki wykazujące fluorescencje stanowiły 7,12 % wszystkich pęcherzyków wydzielanych przez te makrofagi (Ryc. 42).



Rycina 40. Charakterystyka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano w roztworze Hb lub Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, po czym hodowano przez 24h. Pożywkę znad makrofagów kontrolnych, inkubowanych z Hb oraz inkubowanych z Hb-AF488 zbierano, a następnie izolowano z niej pęcherzyki zewnątrzkomórkowe i poddawano analizie NTA. Na wykresie przedstawiono stężenie EVs w pożywce (A) oraz średnicę EVs (B). Wyniki przedstawione są jako średnia z 9 powtórzeń technicznych $\pm$ SD. **p<0.01 (1-czynnikowy test ANOVA z korektą Tukey'a).



Rycina 41. Charakterystyka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych zawierających Hb. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano w roztworze Hb lub Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, po czym hodowano przez 24h. Pożywkę znad makrofagów kontrolnych, inkubowanych z Hb oraz inkubowanych z Hb-AF488 zbierano, a następnie izolowano z niej pęcherzyki zewnątrzkomórkowe i poddawano analizie NTA. Na wykresie przedstawiono stężenie fluorescencyjnych EVs w pożywce (A) oraz średnicę fluorescencyjnych EVs (B). Wyniki przedstawione są jako średnia z 9 powtórzeń technicznych $\pm$ SD.

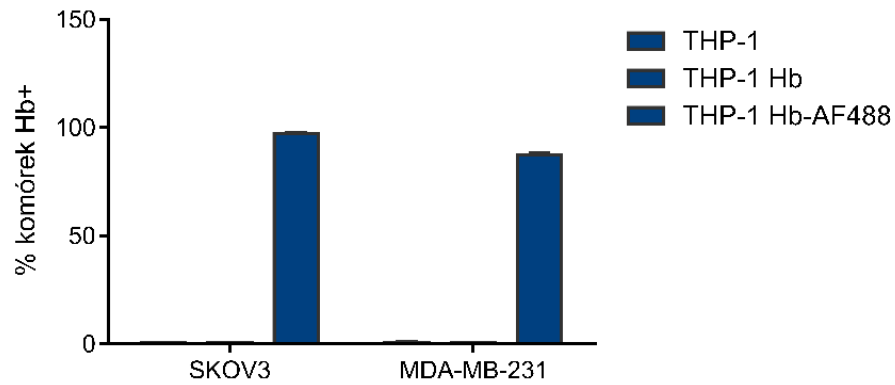


Rycina 42. Odsetek pęcherzyków fluorescencyjnych. Makrofagi różnicowane z linii THP-1 inkubowano w roztworze Hb lub Hb-AF488 o stężeniu 1 mg/ml przez 1 godzinę, po czym hodowano przez 24h. Pożywkę z nad makrofagów kontrolnych, inkubowanych z Hb oraz inkubowanych z Hb-AF488 zbierano, a następnie izolowano z niej pęcherzyki zewnątrzkomórkowe i poddawano analizie NTA. Na wykresie przedstawiono odsetek pęcherzyków fluorescencyjnych w puli wszystkich pęcherzyków. Wyniki przedstawione są jako średnia z 9 powtórzeń technicznych $\pm$ SD.

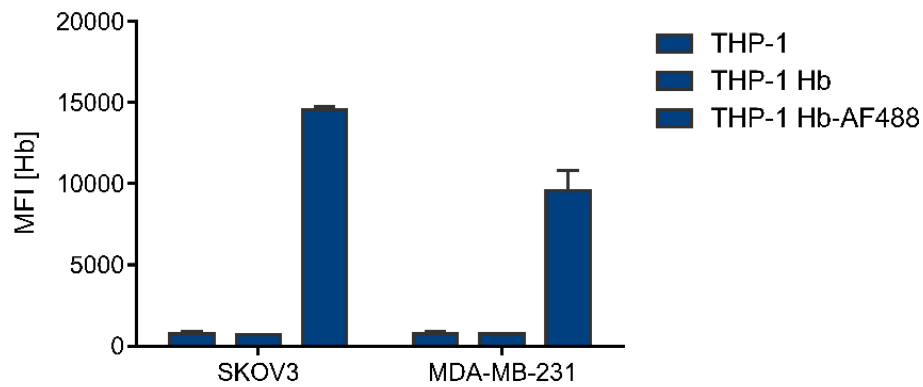
4.6.7.4 Zbadanie pobierania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wydzielanych przez makrofagi w komórkach nowotworowych.

W kolejnym etapie wyizolowane pęcherzyki z pożywki z nad hodowli makrofagów (frakcja 5) podano komórkom nowotworowym i hodowano przez 24 godziny. Po upływie tego czasu, komórki poddano analizie cytometrycznej. Zaobserwowano, że zarówno komórki nowotworowe SKOV-3, jak i MDA-MB-231 pobrały pęcherzyki z Hb, o czym świadczy zmiana średniej fluorescencji w tych komórkach (Ryc. 43B). Analiza cytometryczna wykazała, że 97% komórek linii SKOV-3 i 87% komórek MDA-MB 231 pobrało EVs z Hb z medium (Ryc. 43A).

A



B



Rycina 43. Pobieranie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych zawierających Hb przez komórki nowotworowe. Wyizolowaną frakcję 5. pęcherzyków zewnątrzkomórkowych podano komórkom nowotworowym linii SKOV-3 i MDA-MB 231 na 24 godziny, po czym komórki analizowano przy użyciu cytometru przepływowego. Na wykresie przedstawiono odsetek komórek nowotworowych pozytywnych dla Hb (A) oraz średnią intensywność fluorescencji (MFI) Hb w komórkach nowotworowych (B). Wyniki przedstawione są jako średnia z niezależnych prób $\pm$ SD (n=2).

5. DYSKUSJA

Hemoglobina (Hb) to białko o najwyższym stężeniu we krwi (fizjologicznie 13-17 g/dl [162]). Jest niezwykle ważnym białkiem, odpowiadającym za podstawowy proces, czyli oddychanie (respirację). Dzięki swojej strukturze i unikatowym właściwościom biochemicznym jest idealnym nośnikiem tlenu i dwutlenku węgla. Dla prawidłowego funkcjonowania organizmu i wydolnej wymiany gazowej kluczowa jest odpowiednio wysoka zawartość Hb wewnątrz krwinek czerwonych, natomiast obecność Hb poza komórkami jest zjawiskiem niepożądanym. Jest to konsekwencją toksycznych, prozapalnych i prooksydacyjnych właściwości wolnej Hb oraz uwolnionego z niej hemu, które prowadzą do uszkodzenia tkanek i rozwoju stanów chorobowych [33]. W związku z tym, w organizmie istnieje układ białek i receptorów mający na celu szybkie i skuteczne usunięcie Hb z przestrzeni pozakomórkowej. Podstawowym sposobem zneutralizowania Hb jest związanie jej przez obecna w osoczu haptoglobinę (Hp). Następnie kompleks Hb-Hp ulega endocytozie przez receptor CD163 występujący na monocytach i makrofagach. W komórkach tych Hb podlega degradacji w lizosomach do globiny oraz hemu, które są rozkładane do odpowiednio: aminokwasów oraz biliwerdyny, tlenu węgla i żelaza [44][39]. Jest to kanoniczny szlak metabolizmu Hb, który zapewnia ochronę przed niekorzystnymi skutkami obecności wolnej Hb, pojawiającej się między innym po hemolizie. W niniejszej pracy po raz pierwszy pokazano nieopisany do tej pory szlak przetwarzania Hb w makrofagach, w którym Hb nie jest degradowana, a przekazywana do sąsiadujących komórek, w tym także komórek nowotworowych.

5.1 Pobieranie Hb przez makrofagi

Obecna we krwi, związana z Hp, pozakomórkowa Hb jest wychwytywana przez monocyty krwi [56] oraz makrofagi wątroby i śledziony, które mają dużą ekspresję receptora CD163 [163][39]. W pierwszej części niniejszej pracy pokazano, że spośród PBMC, tylko monocyty wychwytywały Hb (pomimo nieobecności Hp w medium) (Ryc. 12), natomiast wszystkie badane makrofagi (ustalone linie komórkowe oraz komórki pierwotne, ludzkie oraz mysie) efektywnie pobierały Hb (Ryc. 13-15), co potwierdza dane literaturowe. Warto zaznaczyć, że we wszystkich doświadczeniach komórkom podawano Hb bez dodatku Hp, a obecność ludzkiej surowicy jako źródła Hp nie zwiększyła pobierania Hb przez makrofagi (Ryc. 16). Co ciekawe, niektóre z badanych w niniejszej pracy makrofagów efektywnie pobierały Hb mimo braku lub niskiego poziomu mRNA

dla receptora CD163 (Tab. 6). Wyniki te sugerują, że Hb może być pobierana przez makrofagi w sposób niezależny od Hp oraz CD163. Aby to potwierdzić potrzebne są dodatkowe badania, w tym sprawdzenie jak wyciszenie genu dla CD163 wpłynie na pobieranie Hb. Droga pobierania Hb w naszych doświadczeniach może różnić się od kanonicznej ze względu na podawane stężenie Hb, które wynosiło 1 mg/ml. W warunkach fizjologicznych poziom Hp w surowicy jest wysycony przy 0.5-1.5 mg/ml wolnej Hb [164]. Inne źródło podaje, że pobieranie Hb przez makrofagi jest znacznie zwiększone przez obecność Hp przy niskich stężeniach Hb wynoszących około 1 μ g/ml, ale nie przy stężeniach większych niż 100 μ g/ml [62], co wskazuje że w naszych warunkach Hp może nie mieć tak dużego znaczenia w pobieraniu Hb. Z Schaer i wsp. wykazali, że niezwiązana natywna oraz chemicznie zmodyfikowana Hb może być pobierana z udziałem receptora CD163, jednak powinowactwo takiej Hb jest niższe niż kompleksu Hb-Hp [62]. Badany przez nas mechanizm może stanowić uzupełnienie podstawowego mechanizmu detoksykacji Hb, który będzie ważny w wypadku masywnej hemolizy i wysyceniu Hp we krwi. Z dotychczasowych badań wynika, że w przeciwieństwie do układu ludzkiego, u myszy utworzenie kompleksu Hb-Hp nie zwiększa powinowactwa do CD163 [64]. Mimo tego, brak Hp przyczynia się do nasilenia uszkodzeń tkanek związanych z hemolizą [63]. Wykazano również, że delecja CD163 u myszy nie zmienia znacząco kinetyki usuwania Hb [64]. Co więcej, brak CD163 był powiązany ze zmniejszeniem uszkodzenia tkanek w fazie ostrej po krwotoku śródmózgowym [165]. Świadczy to o istnieniu dodatkowych mechanizmów detoksykacyjnych. Przykładem jest pobieranie przez makrofagi i komórki śródbłonna kompleksu Hb, rozpuszczalnej formy CD163 oraz immunoglobuliny IgG (Hb-sCD163-IgG) przy udziale receptora Fc γ R [65]. Innymi znanymi receptorami dla Hb jest F1-ATPaza na hepatocytach [166] oraz megalina i kubulina w proksymalnych kanalikach nerkowych [167]. Bardzo prawdopodobne, że do pobierania Hb makrofagi wykorzystują inny receptor lub jako komórki żerne, zaopatrzone w pełen zestaw rodzajów endocytozy, wykorzystują w tym celu fagocytozę. Wyraźne różnice w mechanizmach detoksykacyjnych Hb u ludzi i myszy powodują, że należy z ostrożnością przenosić wyniki badań dotyczących metabolizmu Hb z modelu mysiego na człowieka [168].

5.2 Wykorzystanie procesu przekazywania Hb w nowym systemie dostarczania leków

Jednym z problemów współczesnej onkologii jest niska skuteczność leczenia guzów litych, głównie z powodu niewystarczającej selektywności terapii. Jedynie bardzo mały odsetek podanej dawki leku (często poniżej 0,1%) dociera do guza i powoduje zabicie komórek nowotworowych, natomiast pozostała część powoduje efekty uboczne w zdrowych tkankach [169]. Stąd, interesującą strategią jest poszukiwanie nowych, skuteczniejszych systemów dostarczania leków do guzów litych. Opisane w niniejszej pracy zjawisko przekazywania Hb z makrofagów do komórek nowotworowych można wykorzystać w terapii przeciwnowotworowej jako sposób dostarczania leków. W potencjalnej terapii, lek byłby przyłączany do Hb. Kompleks ten byłby załadowany do makrofagów różnicowanych z monocytów krwi chorego. Tak przygotowane komórki po podaniu choremu będą migrowały do guza nowotworowego i tam przekazywały kompleks (z lekiem) do komórek mikrośrodowiska nowotworu.

Makrofagi są badane jako nośniki leków z uwagi na ich właściwości fagocytarne umożliwiające pochłonięcie dużej ilości cząsteczek. Dodatkowo, mają zdolność do migracji w kierunku nowotworu, przechodzenia przez naczynia krwionośne oraz penetracji regionów hipoksyjnych guza [169]. Makrofagi jako nośniki testowano w kontekście różnych leków, w tym nanocząstek złota (*gold nanoshells*) w fototerapii glejaka [170], wirusa onkolitycznego w leczeniu raka prostaty [171], paklitakselu enkapsulowanego w nanocząsteczkach w leczeniu raka piersi [172] oraz doksorubicyny w przerzutowym raku jajnika [112]. Z drugiej strony Hb, podobnie jak inne białka wiążące żelazo, jest kandydatem do transportu leków [173]. Terapie z wykorzystaniem koniugatów Hb wynikają bezpośrednio z mechanizmu jej usuwania z krwi i celują w monocyty/makrofagi oraz wątrobę. Zaletą Hb jako nośnika jest duża różnorodność w przyłączeniu potencjalnych leków: wiązania kowalencyjne do amin lub cystein, niekowalencyjne, wodorowe, oddziaływania van der Waalsa i hydrofobowe, a także możliwość substytucji hemu na inną cząsteczkę [173]. Pierwszym lekiem koniugowanym z Hb była rybawiryna, lek przeciwwirusowy stosowany w skojarzeniu z interferonem γ w leczeniu wirusowego zapalenia wątroby typu C, którego dawkowanie jest ograniczone przez skutki uboczne [174]. Brookes i wsp. zsyntetyzował koniugat Hb z 6-7 cząsteczkami rybawiryny w przeliczeniu na tetramer Hb [174]. Koniugat ten hamował wzrost mysiego wirusa wątroby typu 3 efektywniej niż wolna rybawiryna, a dodatkowo wykazywał

przeciwwirusowe działanie *in vivo*, co opisano jako wydłużone przeżycie zwierząt, zmniejszony poziom wirusa oraz lepsze wyniki w ocenie histopatologicznej choroby [175]. Zhengjie i wsp. opracowali metodę usunięcia hemu z Hb i wprowadzenie w jego miejsce paklitakselu, co skutkowało utworzeniem agregatów o kontrolowanej średnicy. W przeliczeniu na tetramer Hb, udało się wprowadzić około 33 cząsteczek leku. Co ciekawe, modyfikacja ta nie zmieniła wiązania do receptora CD163, a po podaniu dożylnym kompleks kumulował się w wątrobie i śledzionie [176]. Interesującym podejściem leczenia obszarów hipoksyjnych guzów było utworzenie liposomów, które były załadowane jednocześnie Hb i doksorubicyną, a także miały Hb na powierzchni. Hb występująca na powierzchni zwiększała selektywność wychwytu przez komórki nowotworowe, natomiast Hb znajdująca się wewnątrz była nośnikiem tlenu, co przyczyniło się do zmniejszenia hipoksji w guzie oraz związanej z hipoksją chemiooporności [177]. Wychwyt Hb przez monocyty/makrofagi wykorzystano w terapii białaczki monocytarnej, w której zastosowano koniugat Hb z kwasem dichlorooctowym [178]. Podobnie, aby zwiększyć wychwyt liposomów przez makrofagi, przyłączono Hb do ich powierzchni [179]. Warto dodać, że obecnie jedna z terapii testowanych w badaniach klinicznych u chorych z rakiem wątroby (NCT03908840) wykorzystuje Hb jako nośnik leku: koniugat Hb z floksurydyną (TBI 302).

Nieopublikowane wyniki naszego zespołu świadczą o tym, że do Hb można przyłączać leki cytotoksyczne, takie jak aurystatyna, derukstekan i mertansyna. Co więcej, w związku z występowaniem w większości guzów litych makrofagów sprzyjających rozwojowi nowotworów (M2), w proponowanym systemie dostarczania leków można również wykorzystać zjawisko przekazywania Hb do makrofagów. Za pomocą cząsteczek immunostymulujących przyłączonych do Hb można wpływać na różnicowanie się makrofagów w kierunku prozapalnych M1.

5.3 Proces przekazywania Hb z makrofagów do komórek nowotworowych

W niniejszej pracy pokazano nieopisane do tej pory zjawisko przekazywania Hb z makrofagów do komórek nowotworowych. Proces ten pokazano przy użyciu cytometrii przepływowej (Ryc. 18) oraz przy użyciu mikroskopii konfokalnej (Ryc. 19), a także potwierdzono za pomocą spektroskopii korelacji fluorescencji (FCS) (Ryc. 23). FCS to metoda stosowana do badania cząsteczek w żywych komórkach poprzez pomiar współczynnika dyfuzji białka w komórce i opiera się na modelu lepkości cytoplazmy

[155][180][156]. Dzięki wykorzystaniu FCS mogliśmy określić, czy przekazywana cząsteczka jest samym fluorochromem, czy Hb skoniugowaną z fluorochromem. Metoda ta niejako uniezależniła nasze obserwacje od fluorochromu, ponieważ pozwoliła na pomiar wielkości cząsteczki. FCS posłużył do potwierdzenia zjawiska przekazywania Hb. Jednak w większości eksperymentów zastosowano cytometrię przepływową z uwagi na szybkość i powtarzalność wyników oraz możliwość badania kilku populacji komórek w badanej próbce.

Korzystając z metody FCS obliczyliśmy promienie tetrameru (2,77 nm), dimeru (2,15 nm) i monomeru Hb (1,85 nm) w roztworach, które są podobne do promieni uzyskanych przy użyciu dynamicznego rozpraszania światła (DLS), które wynoszą odpowiednio 2,81 nm, 2,11 nm i 1,58 nm [181]. Jedynie promień monomeru różni się między metodami, jednak może to wynikać z ograniczenia detekcji metody FCS, stąd wartość 1,85 nm może być średnią z dwóch składowych: dimerów i monomerów. Za pomocą FCS stwierdziliśmy obecność monomerów, dimerów i tetramerów Hb w cytoplazmie MDA-MB-231 po kohodowli z makrofagami inkubowanymi uprzednio z Hb. Mediana współczynnika dyfuzji wskazywała, że tetramer jest dominującą formą Hb w cytoplazmie komórek nowotworowych (Ryc. 23). Ponadto pewna frakcja Hb wykazywała niższy współczynnik dyfuzji, co sugeruje wiązanie Hb z małymi wewnątrzkomórkowymi strukturami błonowymi, takimi jak błony pęcherzyków wewnątrzkomórkowych.

Wszystkie badane makrofagi przekazywały Hb do komórek nowotworowych różnego pochodzenia, co świadczy o powszechności tego zjawiska (Ryc. 18, 20). Do dalszych doświadczeń wybrano makrofagi różnicowane z linii THP-1, ponieważ jest to model ludzki, uniezależniony od zmiennej, jaką są różne osoby będące donorami leukocytów do izolowania monocytów, a dodatkową zaletą jest łatwość w zastosowaniu laboratoryjnym.

W kolejnym etapie niniejszej pracy dokonano szerszej charakterystyki badanego procesu, w tym jego dynamiki. Transfer Hb z makrofagów do komórek nowotworowych jest procesem efektywnym, obserwowano nawet do 100% komórek nowotworowych, które otrzymały Hb po kohodowli z makrofagami inkubowanymi uprzednio z Hb (Ryc. 18). Efektywność transferu różni się między komórkami nowotworowymi (Ryc. 18, 20), dla przykładu, najefektywniejszy transfer z makrofagów THP-1 zaobserwowano

do komórek SKOV3 (Ryc. 18). Podobnie jak pobieranie Hb przez makrofagi (Ryc. 17), tak i przekazywanie Hb (Ryc. 21) rośnie w czasie, co oznacza, że są to procesy ciągłe. Jednak efektywność transferu przestaje rosnać po 24h. Co ciekawe, zjawisko przekazywania Hb nie zależy od stężenia Hb podanej makrofagom w badanym zakresie (0,1-2 mg/ml) (Ryc. 22). Ponadto, Hb jest także przekazywana z makrofagów do makrofagów (Ryc. 24). Wyniki niniejszej pracy wskazują, że proces przekazywania Hb jest specyficzny dla tego białka, ponieważ inne białko (BSA), które jest pobierane przez makrofagi, nie podlega transferowi do współhodowanych komórek (Ryc. 25-26), jednak nieopublikowane dotąd wyniki naszego zespołu pokazują, że inne białka, takie jak ferrytyna, czy transferyna, również są przekazywane z makrofagów do komórek nowotworowych. Natomiast transfer Hb nie jest zjawiskiem selektywnym pod względem komórek „akceptorów”, ponieważ Hb jest przekazywana nie tylko do komórek nowotworowych, ale także do makrofagów (Ryc. 24) oraz fibroblastów (wyniki nieopisane w niniejszej pracy).

5.4 Mechanizm przekazywania Hb z makrofagów do komórek nowotworowych

W związku z niekonwencjonalnym charakterem procesu przekazywania Hb, w następnej części skupiono się na poznaniu mechanizmu przekazywania Hb. Wykazano, że Hb jest przekazywana za pomocą pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.

Wśród zróżnicowanej grupy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (poza ciałkami apoptotycznymi) wyróżnia się egzosomy i mikrocząsteczki, które charakteryzuje inny mechanizm powstawania. Jak nadmieniono we wstępie do niniejszej pracy, egzosomy powstają w ciałkach wielopęcherzykowych, natomiast mikropęcherzyki jako uwypuklenie błony komórkowej. Przyjmuje się, że egzosomy są mniejsze, mają średnicę 30-160 nm, z kolei mikrocząsteczki mają wielkość 50-1000 nm. Podział ze względu na rozmiar pęcherzyków jest nieścisły, ponieważ zakresy nakładają się, a istnieją dowody na istnienie mikrocząsteczek o wielkości egzosomów [182]. W konsekwencji tego, przy braku dostatecznych dowodów na mechanizm powstawania, w literaturze często stosuje się zbiorcze określenie pęcherzyki zewnątrzkomórkowe. Podobnie, w niniejszej pracy, mechanizm powstawania nie został zbadany, dlatego użyto nazwy pęcherzyki zewnątrzkomórkowe.

Pierwszym argumentem wskazującym na mechanizm sekrecyjny było stwierdzenie obecności Hb w strukturach pęcherzykowych za pomocą FCS. W pomiarach przy użyciu

FSC zaobserwowano obecność fluorescencji w strukturach pęcherzykowych komórek nowotworowych kohodowanych z makrofagami inkubowanymi uprzednio z fluorescencyjną Hb. Dopiero po kilku godzinach zaobserwowano fluorescencję w cytoplazmie poza pęcherzykami. Kolejną przesłanką było wykazanie przekazywania Hb poprzez medium kondycjonowane znad makrofagów, co oznaczało, że Hb jest wydzielana do medium, a następnie pobierana przez komórki nowotworowe (Ryc. 39). Następnie, z medium znad makrofagów inkubowanych uprzednio z Hb, wyizolowano frakcje pęcherzyków przy pomocy chromatografii. Pęcherzyki z medium zebranego znad makrofagów THP-1 inkubowanych z Hb-AF488 miały wielkość 130 nm (Ryc. 40B), a ich stężenie wynosiło $2,02 \times 10^9$ pęcherzyków/ml (Ryc. 40A). Wśród tych pęcherzyków 7,12 % stanowiły pęcherzyki z Hb (Ryc. 42). Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe zawierające Hb zostały pobrane przez komórki nowotworowe (Ryc. 43). Przekazywanie pęcherzyków między makrofagami a komórkami nowotworowymi per se, pokazano również przy użyciu barwnika lipofilnego DiD, który jest używany jako marker błon komórkowych (Ryc. 38). Niewykluczone, że część Hb może być wydzielana niezależnie od pęcherzyków i w takiej formie pobierana przez komórki. Kontrargumentem do tej hipotezy jest brak zahamowania przekazywania Hb w obecności wolnej Hb, co oprócz uniezależnienia procesu przekazywania Hb od potencjalnego receptora dla Hb, skłania ku wnioskowi, że wolna Hb nie jest główną formą pobieraną przez komórki nowotworowe w kohodowli (Ryc. 27). Dodatkowo, przekazywanie Hb było zablokowane w kohodowli prowadzonej z wykorzystaniem membrany Transwell® (Ryc. 28), co również skłania ku wnioskowi, że pęcherzyki stanowią dominującą formę Hb przekazywanej z makrofagów. Nieopublikowane wyniki naszego zespołu wskazują, że wolna Hb jest pobierana przez komórki nowotworowe, jednak opisanie pobierania wolnej Hb przez różne rodzaje komórek nie było przedmiotem niniejszego projektu, dlatego te wyniki nie zostały dołączone do dysertacji.

Techniką najczęściej stosowaną do analizy EVs jest cytometria przepływowa. Pozwala na pomiar kilku fluorescencji jednocześnie, a dodatkową zaletą jest szybkość pomiaru. Jej wadą jest jednak limit detekcji, który w tradycyjnych cytometrach wynosi 270 nm-600 nm, natomiast tylko dedykowane cytometry (A50-Micro; Apogee, UK) pozwalają na analizę cząsteczek o rozmiarze 150-190 nm. Z kolei mikroskopia elektronowa, która pozwala na ocenę wielkości i morfologii EVs, jest czasochłonna, a w czasie procedury przygotowania materiału często generowane są artefakty.

W niniejszej pracy wykorzystano NTA (ang. *Nanoparticle Tracking Analysis*), która jest techniką pozwalającą na detekcję cząsteczek poniżej 100 nm, a dodatkowo pozwala na odczyt fluorescencji. Wielkość EVs jest określana na podstawie szybkości ruchów Browna w cieczy. Dane literaturowe wskazują, że z uwagi na rzetelność i powtarzalność pomiarów, NTA może być narzędziem wykorzystywanym do rutynowej analizy EVs [183][184][185].

W niniejszym projekcie wykonywano próby wyjaśnienia roli cytoszkieletu aktynowego oraz mikrotubul w procesie przekazywania Hb. Reorganizacja cytoszkieletu ma duże znaczenie podczas pączkowania i uwalniania błony w czasie tworzenia MVs lub przemieszczania się MVB w kierunku błony komórkowej, a także podczas pobierania EVs [186][182][126]. W badaniach Khan'a i wsp. zastosowanie cytochalazyny D, hamującej polimeryzację aktyny, zmniejszyło wydzielanie egzosomów zawierających anty-apoptotyczne białko surwiwinę z komórek linii HeLa, Panc1 i PC3 [187]. Z drugiej strony, ograniczenie funkcji cytoszkieletu przez cytochalazynę D zmniejszyło pobieranie EVs przez szereg komórek [126], w tym pobieranie egzosomów przez komórki dendrytyczne [188] i EVs przez monocyty [145]. Cytochalazyna D oraz latrunkulina blokowały pobieranie egzosomów przez makrofagi [189] oraz komórki HUVEC [190]. W niniejszej pracy wykazano, że zablokowanie polimeryzacji aktyny przez traktowanie kohodowli cytochalazyną D lub latrunkuliną prawie całkowicie zahamowało przekazywanie Hb z makrofagów do komórek nowotworowych (Ryc. 32). Efekt ten może wynikać zarówno ze zmniejszania wydzielania, jak i pobierania EVs przy niesfunkcjonującej aktynie. Jak opisano w literaturze, wewnątrz komórek, pęcherzyki mogą przemieszczać się na zasadzie dyfuzji lub wzdłuż włókien aktyny, czy mikrotubul [191]. Svensson i wsp. wykazali, że po internalizacji przez komórkę docelową, egzosomy poruszają się po mikrotubulach, a blokowanie ich polimeryzacji przy użyciu nokodazolu hamuje mobilność pęcherzyków [190]. W naszych badaniach przekazywanie Hb było zahamowane w obecności nokodazolu (Ryc. 32), co potwierdza, że mikrotubule są istotne w tym procesie. Jednak w przeprowadzonych przez nas doświadczeniach nie można oddzielić wpływu inhibitorów na poszczególne komórki: dawców i biorców Hb, co jest pewnym ograniczeniem, ponieważ uniemożliwia to określenie, czy działanie danego związku wynika z jego wpływu na uwalnianie czy na pobieranie Hb. Dodatkowo, zahamowane struktury, takie jak aktyna, są uniwersalne dla wielu procesów w komórce. W związku z tym, aby bardziej szczegółowo opisać mechanizm przekazywania Hb,

wykorzystano inhibitory wybranych mediatorów polimeryzacji aktyny. Jednak skutki ich działania nie są jednoznaczne, ich wpływ na przekazywanie Hb jest zależny od komórek nowotworowych (Ryc. 33). Wyjątek stanowią związki Y27632 i H1152 hamujące kinazę ROCK, które istotnie zwiększały przekazywanie Hb (Ryc. 33). Warto zauważyć, że Y27632 jest znanym inhibitorem wydzielania EVs [182]. Z drugiej strony, istnieją doniesienia literaturowe, które wskazują, że zahamowanie ROCK, wpływającej na tworzenie włókien stresowych (ang. *stress fibers*), może zwiększać pulę wolnej G-aktyny na korzyść innych struktur aktynowych, np. TNT [192]. Możliwe, że takie zjawisko zadziało w naszych doświadczeniach – wolna G-aktyna posłużyła do tworzenia EVs. W niniejszej pracy wykorzystano również inhibitory transportu błonowo-pęcherzykowego w komórce: monenzynę i brefeldynę A, których użycie spowodowało zhamowanie przekazywania Hb (Ryc. 30). Według dostępnych danych literaturowych, monenzyna zwiększa uwalnianie egzosomów [193] lub nie ma wpływu na wydzielanie egzosomów [187], co jest rozbieżne z naszymi wynikami. Prawdopodobnie jest to rezultat szerokiego spektrum działania wykorzystanego inhibitora lub różnych modeli eksperymentalnych.

Ciekawą obserwacją było zablokowanie przekazywania Hb w kohodowli na membranach Transwell® (Ryc. 28). Wskazywało to na mechanizm zależny od bezpośredniego kontaktu między komórkami (np. TNTs), a nie rodzaj sekrecji. Takiego rodzaju doświadczenia są powszechnie stosowane w celu odróżnienia komunikacji za pomocą pęcherzyków zewnątrzkomórkowych i TNTs. Jednak dane literaturowe wskazują, że TNTs mogą penetrować przez 0,4 μm pory w membranie Transwell®, a z drugiej strony ta sama membrana Transwell® może hamować transfer egzosomów nawet o 85% [183]. Przechodzenie egzosomów może zależeć od wielkości porów w membranie. Pokazano, że transfer małych cząsteczek RNA (ang. *small RNA*) w egzosomach z limfocytów B do komórek dendrytycznych jest zahamowany w kohodowli prowadzonej przez membranę o porach 0,4 μm , natomiast zachodzi przez pory o średnicy 1 μm . Mimo tego, że egzosomy mają wielkość 30-160 nm, to mogą występować w klasterach i agregatach [194], co może wpływać na ich transfer przez pory membrany. Co prawda zastosowana w naszych doświadczeniach membrana o średnicy 1 μm nie powinna uniemożliwić przenikania pęcherzyków o wielkości 130 nm, to jednak fizyczne odsunięcie populacji produkującej pęcherzyki i biorców pęcherzyków mogło spowodować wyraźne zahamowanie transferu Hb. Powyższe dane sugerują, że wykorzystanie membrany Transwell® w rozróżnieniu TNTs i EVs nie jest jednoznaczne

w interpretacji. Podobne przesłanki w kierunku mechanizmu wymagającego bezpośredniego kontaktu wynikają z faktu, iż transfer Hb rośnie wraz z gęstością komórek (Ryc. 27). Jednak w kontekście pęcherzyków zewnątrzkomórkowych można to wytłumaczyć większą liczbą wydzielanych pęcherzyków w wypadku większej liczby komórek oraz mniejszym dystansem między donorami, a akceptorami Hb przy gęstszej kohodowli. Dodatkowo, czynniki takie jak gęstość komórek, stymulacja komórek związkami egzogennymi, zmiana warunków hodowli mogą mieć potencjalny wpływ na wydzielanie EVs – liczbę i skład [195]. W naszych badaniach zaobserwowaliśmy, że brak surowicy w pożywce w trakcie kohodowli (głodzenie) zwiększa transfer Hb. Może to wynikać ze zwiększonego uwalniania EVs w tych warunkach. Li i wsp. pokazali, że w warunkach głodzenia komórki neuroblastomy N2a uwalniają większą liczbę EVs w porównaniu do hodowli z surowicą [196]. Z drugiej strony, składniki surowicy mogą interferować z procesem pobierania EVs przez komórki nowotworowe.

Jak wspomniano we wstępie niniejszej pracy (podrozdział 1.4), oprócz pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, do ważnych sposobów komunikacji zalicza się połączenia szczelinowe oraz TNTs. Hb, jako cząsteczka o masie powyżej 1 kDa, z definicji nie jest transferowana przez połączenia szczelinowe [68]. Zbadanie znaczenia TNTs stanowi uzupełnienie powyżej skomentowanych wyników. Przy użyciu mikroskopii konfokalnej wykazano, że między makrofagami a komórkami nowotworowymi są tworzone bogate w aktynę cienkie struktury, które można określić jako TNTs, aczkolwiek tylko sporadycznie obserwowano w nich Hb (Ryc. 34). Co więcej, zastosowanie wytrząsania kohodowli, które mechanicznie uszkadza TNTs [83][158][159], nie wpłynęło na efektywność transferu (Ryc. 35), co potwierdza niezależność przekazywania Hb od TNTs. Dopełnieniem badania roli TNTs była ocena znaczenia białka M-Sec, regulatora tworzenia TNTs [94][161][160]. Zaobserwowano, że zmniejszenie ilości M-Sec, w makrofagach i/lub w komórkach nowotworowych nie zaburzyło wydajności transferu Hb (Ryc. 37). Podsumowując, wyniki opasujące transfer Hb sugerują, że niecała pula pobranej przez makrofagi Hb jest degradowana. Przeciwnie, znaczna frakcja Hb jest uwalniana z makrofagów, przynajmniej częściowo w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych. Następnie uwolniona Hb jest pobierana przez komórki obecne w bezpośrednim sąsiedztwie makrofagów, w których po kilku godzinach Hb jest uwalniana z pęcherzyków do cytoplazmy.

W niniejszej pracy udowodniliśmy transfer jednego białka, jednak nie wykluczyliśmy jednoczesnego transferu innych białek wewnątrz pęcherzyków, ponieważ transfer pęcherzyków umożliwia transfer zestawu białek [107]. Kolba i wsp. pokazali, że wśród białek przenoszonych w pęcherzykach z komórek zrębu do komórek białaczkowych były dwa łańcuchy embrionalnej Hb: γ i ζ [107]. Co ciekawe, zgodnie z bazą Exocarta łańcuchy hemoglobiny znaleziono w egzosmach izolowanych z moczu ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β , $\gamma 1$, $\gamma 2$, δ , ϵ), osocza ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β , δ) oraz w egzosmach wydzielanych przez różne komórki nowotworowe ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β , $\gamma 1$, $\gamma 2$, δ , ϵ) i grasicę ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β , $\gamma 1$, $\gamma 2$).

5.5 Przekazywanie Hb a gospodarka żelazem

Dziennie zużycie żelaza do syntezy Hb w szpiku kostnym wynosi 20-25 mg. W jelitach dziennie absorbowany jest 1-2 mg żelaza pochodzącego z diety. W porównaniu do zapotrzebowania, żelazo wchłonięte w jelicie stanowi niewielką część i kompensuje jedynie utratę żelaza z naskórkiem, nabłonkiem jelitowym i krwawieniem menstruacyjnym. W związku z tym, utrzymanie homeostazy żelaza na poziomie ogólnoustrojowym wymaga odzysku żelaza, a kluczową rolę w tym procesie odgrywają makrofagi [197]. Z uwagi na obecność żelaza w Hb, wydaje się, że opisany w niniejszej pracy proces uwalniania i transferu Hb może mieć znaczenie w obiegu żelaza. Jednak przypuszczenia te możemy ograniczyć jedynie do sytuacji hemolizy, która jest charakterystyczną cechą kliniczną kilku chorób. Przykładami są anemia sierpowata, w przebiegu której stężenie wolnej Hb w osoczu mieści się w zakresie 0,01-0,41 mg/ml oraz nocna napadowa hemoglobinuria, w przebiegu której stężenie wolnej Hb wynosi 0,5-2 mg/ml, a w czasie epizodu hemolitycznego może wynosić nawet 10 mg/ml [34]. U wielokrotnie dializowanych pacjentów stężenie wolnej Hb może mieć wartość 30 mg/ml [34], natomiast u pacjentów wentylowanych mechanicznie obserwuje się stężenie wolnej Hb powyżej 1 mg/ml [198]. Wysokie wartości wolnej Hb (20 g/ml) występuje także u pacjentów z posocznicą i wiąże się niezależnie z ryzykiem zgonu [199]. Stosowane przez nas stężenie Hb podczas inkubacji z makrofagami wynosiło 0,1-1 mg/ml i mieści się w występującym podczas hemolizy zakresie. W związku z tym nasz układ eksperymentalny można odnieść do sytuacji obecnej w niektórych stanach patologicznych.

Pozyskiwanie żelaza zależy do rodzaju komórki i zachodzi różnymi drogami, głównie przez transferynę/receptor transferynowy, transporter metali dwuwartościowych (DMT1, ang. *divalent metal transporter-1*), erytrofagocytosę, receptory CD163 i CD91.

Natomiast żelazo jest eksportowane przez większość komórek za pomocą ferroportyny [200][201]. Doniesienia literaturowe wskazują, że wydzielanie hemu [202] i ferrytyny [203] stanowi alternatywny sposób wypływu żelaza z komórek. Opisane w niniejszej pracy wydzielanie Hb wydaje się stanowić kolejną formę. Hem jest eksportowany z makrofagów przez receptor FLVCR1 [202]. Wydaje się, że eksport hemu z makrofagów jest kluczowy przede wszystkim w wewnątrzkomórkowej homeostazie hemu w makrofagach, których funkcją jest pobieranie hemu. Dodatkowo, sama cząsteczka hemu ma wpływ na różnicowanie i funkcje makrofagów. Niemniej, konieczność eksportu hemu jest zjawiskiem dyskusyjnym, ponieważ makrofagi posiadają możliwość syntezy oraz degradacji hemu, a dodatkowo, jak wspomniano we wstępie (podrozdział 1.2), hem jest cząsteczką o właściwościach prozapalnych i prooksydacyjnych, w związku z tym jego obecność w przestrzeni pozakomórkowej jest potencjalnie niebezpieczna [204]. Jednak, badania Quigley i wsp. potwierdzają, że eksport hemu jest ważny w ujęciu ogólnoustrojowym, wykazano bowiem, że brak genu dla receptora FLVCR1 upośledza recykling żelaza i uniemożliwia prawidłową hematopoezę [202][205]. Z drugiej strony, wydzielanie ferrytyny jest potwierdzone przez jej obecność w surowicy, płynie mózgowo-rdzeniowym i mazi stawowej. Komórkami wydzielającymi ferrytynę są głównie makrofagi, a wydzielanie jest zwiększone po erytrofagocytozie lub podaniu żelaza [206][207]. Ferrytyna jest wydzielana z makrofagów dwiema drogami: wydzielnicze lizosomy/autofagoosmy lub w egzosomach [208]. Podobnie, Hb jest wydzielana z makrofagów w formie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Tak jak w wypadku Hb, zjawisko wydzielania ferrytyny nie jest do końca wyjaśnione. Ferrytyna wydzielana przez komórki w hodowli *in vitro* jest bogata w podjednostkę H, a ferrytyna w osoczu uboga w podjednostkę H [203]. Świadczy to o tym, że komórki wydzielające osoczkową ferrytynę nie są zidentyfikowane lub ferrytyna bogata w podjednostkę H jest pobierana przez komórki znajdujące się w pobliżu makrofagów [206]. Hipotezę tę potwierdza zaobserwowane przez nasz zespół, nieopublikowane do tej pory zjawisko przekazywania ferrytyny z makrofagów do sąsiadujących komórek (makrofagów, komórek prawidłowych i nowotworowych). Możliwe, że ferrytyna H jest przekazywana w egzosomach i w związku z tym nigdy nie znajduje się w stanach fizjologicznych jako wolna ferrytyna w osoczu [208]. Mimo tego, że ferrytyna surowicza jest uboga w podjednostkę H, a co za tym idzie uboga w żelazo, wydaje się mieć udział w międzytkankowej dystrybucji żelaza, zwłaszcza lokalnie lub między komórkami wyspecjalizowanymi w pobieraniu (makrofagi) i magazynowaniu żelaza (hepatocyty) oraz głównymi konsumentami żelaza (prekursory

erytropoezy) [203][206]. Sibille i wsp. wykazał, że ferrytyna uwolniona z makrofagów jest pobierana przez hepatocyty, co zwiększa w nich pulę żelaza, jednak w swoich badaniach nie przeprowadzili kohodowli komórek [209]. Natomiast w literaturze opisano bezpośredni transfer ferrytyny z makrofagów do prekursorów erytropoezy, co stanowiło źródło żelaza w wypadku niedostatku transferryny [49]. Badania Schonberg'a i McTigue'a sugerują, że w tkance mózgowej komórki mikrogleju wydzielają ferrytynę, która stanowi źródło żelaza niezbędnego do rozwoju i dojrzewania oligodendrocytów [210]. Transfer fluorescencyjnej ferrytyny z makrofagów do komórek NG2 (komórki progenitorowe oligodendrocytów) pokazano *in vivo* w modelu mysim [211]. Mukherjee i wsp. wykazali, że oligodendrocyty wydzielają ferrytynę w dwóch pulach: pozapęcherzykowej i w związanej z pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi. Proces ten ma charakter neuroprotekcyjny, ponieważ zakłócenie wydzielania pęcherzyków lub zmniejszenie ilości ferrytyny w oligodendrocytach powoduje utratę neuronów oraz uszkodzenie oksydacyjne tkanki mózgowej [212].

Podsumowując, transfer białek i cząsteczek wiążących żelazo jest ważny dla prawidłowej gospodarki żelazem, a transfer Hb między komorami wydaje się być jej potencjalnym elementem.

Być może eksport Hb zawierającej żelazo jest mechanizmem chroniącym przeładowaniem Hb/hemem/żelazem i ferroptozą. Ferroptoza jest zależnym od żelaza rodzajem programowanej śmierci komórki. Po raz pierwszy została opisana w 2012 roku [213]. Ferroptoza następuje w wyniku peroksydacji lipidów przez wolne rodniki tlenowe generowane z udziałem żelaza [214]. W przeciwieństwie do apoptozy, podczas ferroptozy dochodzi do uwolnienia zawartości wnętrza komórki w wyniku przerwania ciągłości błony, uwolnienia cząsteczek DAMP, czyli wzorców molekularnych związanych z uszkodzeniem (ang. *damage-associated molecular patterns*) [214]. Sugeruje to, że występowanie tego rodzaju śmierci nie jest obojętne dla otoczenia, przeciwnie, wzbudza odpowiedź układu odpornościowego i rozwój zapalenia. Liczne badania wskazują, że Hb może indukować śmierć komórek. W wypadku masywnej hemolizy, dochodzi do przeładowania zdolności detoksykacyjnych rezydualnych makrofagów wątroby (komórek Kupffera) i ich śmierci, w wyniku czego dochodzi do rekrutacji monocytów ze szpiku i różnicowania ich w makrofagi [52]. Podobnie w śledzionie, podczas zwiększonej erytrofagocytozy następującej po transfuzji nieprawidłowo długo przechowywanych RBC dochodzi do ferroptozy makrofagów miazgi czerwonej. Mechanizm kompensujący stanowi

prolifracja pozostałych makrofagów oraz rekrutacja monocytów które wyróżniają się w dojrzałe makrofagi [54]. Dodatkowo, Li i wsp. pokazali, że długotrwała ekspozycja na Hb powoduje ferroptozę w komórkach mioglegiu. To właśnie akumulacja żelaza pochodzącego z Hb indukowała peroksydację lipidów, ferroptozę komórek, a następnie uwolnienie cząsteczek prozapalnych i uszkodzenie neuronów [215]. Wydaje się zatem, że usunięcie Hb z makrofagów pozwala na zmniejszenie obciążenia żelazem oraz na wydłużenie przeżycia makrofagów. W niniejszej pracy pokazano, że makrofagi przekazują Hb innym makrofagom. Uwalnianie Hb pozwala na podział obciążenia żelazem pomiędzy komórki sąsiadujące, a dodatkowo eksport w formie pęcherzyków chroni do pewnego stopnia przed działaniem wolnej Hb.

Podsumowując, w niniejszej pracy wykazano, że Hb może być przekazywana z makrofagów do sąsiadujących komórek w formie zewnątrzkomórkowych pęcherzyków. Ze względu na fakt, że jest to proces opisany po raz pierwszy w niniejszej pracy, jego lepsze poznanie wymaga dalszych badań.

6. WNIOSKI

Na podstawie wyników uzyskanych w części doświadczalnej niniejszej rozprawy doktorskiej wyciągnięto następujące wnioski:

- Spośród jednojądrzastych komórek krwi obwodowej tylko monocyty pobierają Hb.
- Do efektywnego pobierania Hb przez makrofagi nie jest konieczna ekspresja CD163 i obecność haptoglobiny.
- Hb jest wydzielana z makrofagów w formie zewnątrzkomórkowych pęcherzyków.
- Hb zawarta w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych może być przekazywana z makrofagów do sąsiadujących komórek, w tym komórek nowotworowych.
- Mechanizm przekazywania Hb z makrofagów do komórek nowotworowych można wykorzystać w nowej komórkowej terapii przeciwnowotworowej.

BIBLIOGRAFIA

- [1] T. A. Wynn, A. Chawla, and J. W. Pollard, "Macrophage biology in development, homeostasis and disease," *Nature*, vol. 496, no. 7446, pp. 445–455, 2013.
- [2] S. Gordon and A. Plüddemann, "Tissue macrophages: Heterogeneity and functions," *BMC Biol.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–18, 2017.
- [3] M. Theret, R. Mounier, and F. Rossi, "The origins and non-canonical functions of macrophages in development and regeneration," *Dev.*, vol. 146, no. 9, pp. 1–14, 2019.
- [4] P. J. Murray *et al.*, "Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines," *Immunity*, vol. 41, no. 1, pp. 14–20, 2014.
- [5] P. J. Murray and T. A. Wynn, "Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 89, no. 4, pp. 557–563, 2011.
- [6] X. Zhang and D. Mosser, "Macrophage activation by endogenous danger signals," *J. Pathol.*, no. 214, pp. 161–178, 2008.
- [7] K. Y. Lee, "M1 and M2 polarization of macrophages: a mini-review," *Med. Biol. Sci. Eng.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–5, 2019.
- [8] P. J. Murray and T. A. Wynn, "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 11, pp. 723–737, 2011.
- [9] S. Gordon and F. O. Martinez, "Alternative activation of macrophages: Mechanism and functions," *Immunity*, vol. 32, no. 5, pp. 593–604, 2010.
- [10] A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati, "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization," *Trends Immunol.*, vol. 25, no. 12, pp. 677–686, 2004.
- [11] D. M. Mosser and J. P. Edwards, "Exploring the full spectrum of macrophage activation," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 8, no. 12, pp. 958–969, 2008.
- [12] E. Cendrowicz, Z. Sas, E. Bremer, and T. P. Rygiel, "The role of macrophages in cancer development and therapy," *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 8, 2021.
- [13] S. G. Bell, "An introduction to hemoglobin physiology.," *Neonatal Netw.*, vol. 18, no. 2, pp. 9–15, 1999.
- [14] J. E. Hall and A. C. Guyton, *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2011.
- [15] C. S. Thom, C. F. Dickson, D. A. Gell, and M. J. Weiss, "Hemoglobin Variants : Biochemical Properties and Clinical Correlates," 2015.
- [16] R. K. Murray, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, V. W. Rodwell, and P. A. Weil, *Harper's Illustrated Biochemistry*. 2009.
- [17] L. Stryer, *Biochemia*. 2003.
- [18] I. U. Heinemann, M. Jahn, and D. Jahn, "The biochemistry of heme biosynthesis," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 474, no. 2, pp. 238–251, 2008.
- [19] D. Chiabrando, S. Mercurio, and E. Tolosano, "Heme and erythropoiesis: More than a structural role," *Haematologica*, vol. 99, no. 6, pp. 973–983, 2014.
- [20] I. J. Schultz, C. Chen, B. H. Paw, and I. Hamza, "Iron and porphyrin trafficking in heme biogenesis," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 35, pp. 26753–26759, 2010.
- [21] I. K. Quaye, "Extracellular hemoglobin: The case of a friend turned foe," *Front. Physiol.*, vol. 6, no. MAR, pp. 1–13, 2015.
- [22] U. Jay, "Methemoglobin—It's Not Just Blue: A Concise Review," *Am. J. Hematol.*, vol. 82, no. 9, pp. 807–811, 2007.
- [23] F. Kuma, "Properties of methemoglobin reductase and kinetic study of methemoglobin reduction," *J. Biol. Chem.*, vol. 256, no. 11, pp. 5518–5523, 1981.
- [24] T. L. Mollan and A. I. Alayash, "Redox Reactions of Hemoglobin: Mechanisms of Toxicity and Control," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 18, no. 17, pp. 2251–2253, 2013.
- [25] E. Zaporozhna and I. Jarocka, "Hemoglobin – source of reactive oxygen species," *Postepy Hig. Med. Dosw.*, vol. 67, pp. 214–220, 2013.
- [26] J. M. Rifkind, J. G. Mohanty, and E. Nagababu, "The pathophysiology of extracellular

- hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions,” *Front. Physiol.*, vol. 6, no. JAN, pp. 1–7, 2015.
- [27] D. J. Schaer, P. W. Buehler, A. I. Alayash, J. D. Belcher, and G. M. Vercellotti, “Hemolysis and free hemoglobin revisited: Exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins,” *Blood*, vol. 121, no. 8, pp. 1276–1284, 2013.
 - [28] G. Silva, V. Jeney, Â. Chora, R. Larsen, J. Balla, and M. P. Soares, “Oxidized hemoglobin is an endogenous proinflammatory agonist that targets vascular endothelial cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 43, pp. 29582–29595, 2009.
 - [29] G. Balla, H. S. Jacob, J. W. Eaton, J. D. Belcher, and G. M. Vercellotti, “Hemin: A possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 11, no. 6, pp. 1700–1711, 1991.
 - [30] F. A. D. T. G. Wagener *et al.*, “Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase,” *Blood*, vol. 98, no. 6, pp. 1802–1811, 2001.
 - [31] V. Jeney *et al.*, “Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme,” *Blood*, vol. 100, no. 3, pp. 879–887, 2002.
 - [32] M. J. Tracz, J. Alam, and K. A. Nath, “Physiology and pathophysiology of heme: Implications for kidney disease,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 18, no. 2, pp. 414–420, 2007.
 - [33] R. P. Rother, L. Bell, and P. Hillmen, “The Clinical Sequelae of Intravascular Hemolysis and Extracellular Plasma Hemoglobin,” vol. 293, no. 13, pp. 1653–1662, 2015.
 - [34] T. Misztal and M. Tomasiak, “Patofizjologiczne konsekwencje hemolizy . Rola wolnej hemoglobiny Pathophysiological consequences of hemolysis . Role of cell-free hemoglobin,” pp. 627–639, 2011.
 - [35] M. J. Nielsen, H. J. Møller, and S. K. Moestrup, “Hemoglobin and heme scavenger receptors,” *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 12, no. 2, pp. 261–273, 2010.
 - [36] M. Madsen, J. H. Graversen, and S. K. Moestrup, “Haptoglobin and CD163: Captor and receptor gating hemoglobin to macrophage lysosomes,” *Redox Rep.*, vol. 6, no. 6, pp. 386–388, 2001.
 - [37] S. Fagoonee *et al.*, “Plasma protein haptoglobin modulates renal iron loading,” *Am. J. Pathol.*, vol. 166, no. 4, pp. 973–983, 2005.
 - [38] P. W. Buehler *et al.*, “Haptoglobin preserves the CD163 hemoglobin scavenger pathway by shielding hemoglobin from peroxidative modification,” *Blood*, vol. 113, no. 11, pp. 2578–2586, 2009.
 - [39] M. Kristiansen *et al.*, “Identification of the haemoglobin scavenger receptor,” *Nature*, vol. 409, no. 6817, pp. 198–201, 2001.
 - [40] C. A. Schaer, G. Schoedon, A. Imhof, M. O. Kurrer, and D. J. Schaer, “Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin,” *Circ. Res.*, vol. 99, no. 9, pp. 943–950, 2006.
 - [41] I. Gomes *et al.*, “Hemoglobin-derived peptides as novel type of bioactive signaling molecules,” *AAPS J.*, vol. 12, no. 4, pp. 658–669, 2010.
 - [42] B. A. Ehrenreich, “Fate of Hemoglobin Pincytosed By Macrophages in Vitro,” *J. Cell Biol.*, vol. 38, no. 1, pp. 244–248, 1968.
 - [43] D. J. Schaer, A. I. Alayash, and P. W. Buehler, “Gating the radical hemoglobin to macrophages: The anti-inflammatory role of CD163, a scavenger receptor,” *Antioxidants Redox Signal.*, vol. 9, no. 7, pp. 991–999, 2007.
 - [44] J. H. Thomsen, A. Etzerodt, P. Svendsen, and S. K. Moestrup, “The haptoglobin-cd163-heme oxygenase-1 pathway for hemoglobin scavenging,” *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2013, 2013.
 - [45] T. Korolnek and I. Hamza, “Macrophages and iron trafficking at the birth and death of red cells,” *Blood*, vol. 125, no. 19, pp. 2893–2897, 2015.
 - [46] M. J. Nielsen *et al.*, “Haptoglobin-related protein is a high-affinity hemoglobin-binding plasma protein,” *Blood*, vol. 108, no. 8, pp. 2846–2849, 2006.
 - [47] V. Hvidberg, M. B. Maniecki, C. Jacobsen, P. Højrup, H. J. Møller, and S. K. Moestrup, “Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes,” *Blood*, vol. 106, no. 7, pp. 2572–2579, 2005.

- [48] D. J. Schaer and P. W. Buehler, "Cell-free hemoglobin and its scavenger proteins: New disease models leading the way to targeted therapies," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 3, no. 6, 2013.
- [49] M. J. Leimberg, E. Prus, A. M. Konijn, and E. Fibach, "Macrophages function as a ferritin iron source for cultured human erythroid precursors," *J. Cell. Biochem.*, vol. 103, no. 4, pp. 1211–1218, 2008.
- [50] T. R. L. Klei, S. M. Meinders, T. K. van den Berg, and R. van Bruggen, "From the cradle to the grave: The role of macrophages in erythropoiesis and erythrophagocytosis," *Front. Immunol.*, vol. 8, no. FEB, 2017.
- [51] M. W. Hentze, M. U. Muckenthaler, B. Galy, and C. Camaschella, "Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism," *Cell*, vol. 142, no. 1, pp. 24–38, 2010.
- [52] I. Theurl *et al.*, "On-demand erythrocyte disposal and iron recycling requires transient macrophages in the liver," *Nat. Med.*, vol. 22, no. 8, pp. 945–951, 2016.
- [53] H. Kondo, K. Saito, J. P. Grasso, and P. Aisen, "Iron metabolism in the erythrophagocytosing Kupffer cell," *Hepatology*, vol. 8, no. 1, pp. 32–38, 1988.
- [54] L. A. Youssef *et al.*, "Increased erythrophagocytosis induces ferroptosis in red pulp macrophages in a mouse model of transfusion," *Blood*, vol. 131, no. 23, pp. 2581–2593, 2018.
- [55] K. W. and J. JH, "The sites of hemoglobin catabolism," *Blood*, no. 26, pp. 705–719, 1965.
- [56] C. a Schaer, F. Vallelia, A. Imhof, G. Schoedon, and D. J. Schaer, "CD163-expressing monocytes constitute an endotoxin-sensitive Hb clearance compartment within the vascular system.," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 82, no. 1, pp. 106–110, 2007.
- [57] S. K. A. Law *et al.*, "A new macrophage differentiation antigen which is a member of the scavenger receptor superfamily," *Eur. J. Immunol.*, vol. 23, no. 9, pp. 2320–2325, 1993.
- [58] C. Sánchez, N. Doménech, J. Vázquez, F. Alonso, A. Ezquerro, and J. Domínguez, "The porcine 2A10 antigen is homologous to human CD163 and related to macrophage differentiation," *J. Immunol.*, vol. 162, no. 9, pp. 5230–5237, 1999.
- [59] P. Högger, J. Dreier, A. Droste, F. Buck, and C. Sorg, "Identification of the Integral Membrane Protein RM3/1 on Human Monocytes as a Glucocorticoid-Inducible Member of the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Family (CD163)," *J. Immunol.*, vol. 161, pp. 1883–1890, 1998.
- [60] C. Buehler, M. Ritter, E. Orsó, T. Langmann, J. Klucken, and G. Schmitz, "Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli," *J. Leukoc. Biol.*, vol. 67, no. 1, pp. 97–103, 2000.
- [61] C. B. F. Andersen *et al.*, "Structure of the haptoglobin-hemoglobin complex," *Nature*, vol. 489, no. 7416, pp. 456–459, 2012.
- [62] D. J. Schaer *et al.*, "CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin," *Blood*, vol. 107, no. 1, pp. 373–380, 2006.
- [63] S. K. Lim *et al.*, "Increased susceptibility in Hp knockout mice during acute hemolysis," *Blood*, vol. 92, no. 6, pp. 1870–1877, 1998.
- [64] A. Etzerodt, M. Kjolby, M. J. Nielsen, M. Maniecki, P. Svendsen, and S. K. Moestrup, "Plasma Clearance of Hemoglobin and Haptoglobin in Mice and Effect of CD163 Gene Targeting Disruption. Antioxidants & Redox Signaling, 18(17), 2254–2263. https:," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 18, no. 17, pp. 2254–2263, 2013.
- [65] K. Subramanian, R. Du, N. S. Tan, B. Ho, and J. L. Ding, "CD163 and IgG Codefend against Cytotoxic Hemoglobin via Autocrine and Paracrine Mechanisms," *J. Immunol.*, vol. 190, no. 10, pp. 5267–5278, 2013.
- [66] M. Kohyama *et al.*, "Role for Spi-C in the development of red pulp macrophages and splenic iron homeostasis," *Nature*, vol. 457, no. 7227, pp. 318–321, 2009.
- [67] M. B. Maniecki *et al.*, "Impaired CD163-mediated hemoglobin-scavenging and severe toxic symptoms in patients treated with gemtuzumab ozogamicin," *Blood*, vol. 112, no. 4, pp. 1510–1514, 2008.
- [68] N. M. Kumar and N. B. Gilula, "The gap junction communication channel," *Cell*, vol. 84, no. 3, pp. 381–388, 1996.

- [69] L. A. B. Elias and A. R. Kriegstein, "Gap junctions: multifaceted regulators of embryonic cortical development," *Trends Neurosci.*, vol. 31, no. 5, pp. 243–250, 2008.
- [70] C.-J. Wei, X. Xu, and C. W. Lo, "Connexins and Cell Signaling in Development and Disease," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 20, no. 1, pp. 811–838, 2004.
- [71] D. W. Laird, "The gap junction proteome and its relationship to disease," *Trends Cell Biol.*, vol. 20, no. 2, pp. 92–101, 2010.
- [72] A. L. Harris, "Voltage-sensing and substate rectification: Moving parts of connexin channels," *J. Gen. Physiol.*, vol. 119, no. 2, pp. 165–169, 2002.
- [73] M. S. Nielsen, L. N. Axelsen, P. L. Sorgen, V. Verma, M. Delmar, and N. H. Holstein-Rathlou, "Gap junctions," *Compr. Physiol.*, vol. 2, no. 3, pp. 1981–2035, 2012.
- [74] M. Z. Totland, N. L. Rasmussen, L. M. Knudsen, and E. Leithe, "Regulation of gap junction intercellular communication by connexin ubiquitination: physiological and pathophysiological implications," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 77, no. 4, pp. 573–591, 2020.
- [75] M. Srinivas, V. K. Verselis, and T. W. White, "Human diseases associated with connexin mutations," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1860, no. 1, pp. 192–201, 2018.
- [76] A. Rustom, R. Saffrich, I. Markovic, P. Walther, and H. Gerdes, "Nanotubular Highways for Intercellular Organelle Transport," *Science (80-.)*, vol. 303, no. 5660, pp. 1007–1010, 2004.
- [77] S. J. Hanna, K. McCoy-Simandle, E. Leung, A. Genna, J. Condeelis, and D. Cox, "Tunneling nanotubes, a novel mode of tumor cell-macrophage communication in tumor cell invasion," *J. Cell Sci.*, vol. 132, no. 3, 2019.
- [78] S. C. Watkins and R. D. Salter, "Functional connectivity between immune cells mediated by tunneling nanotubules," *Immunity*, vol. 23, no. 3, pp. 309–318, 2005.
- [79] M. Koyanagi, R. P. Brandes, J. Haendeler, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler, "Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: A novel mechanism for cell fate changes?," *Circ. Res.*, vol. 96, no. 10, pp. 1039–1041, 2005.
- [80] H. R. Chinnery, E. Pearlman, and P. G. McMenamin, "Cutting Edge: Membrane Nanotubes In Vivo: A Feature of MHC Class II + Cells in the Mouse Cornea," *J. Immunol.*, vol. 180, no. 9, pp. 5779–5783, 2008.
- [81] M. Osswald *et al.*, "Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network," *Nature*, vol. 528, no. 7580, pp. 93–98, 2015.
- [82] K. Gousset *et al.*, "Prions hijack tunnelling nanotubes for intercellular spread," *Nat. Cell Biol.*, vol. 11, no. 3, pp. 328–336, 2009.
- [83] S. Sowinski *et al.*, "Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission," *Nat. Cell Biol.*, vol. 10, no. 2, pp. 211–219, 2008.
- [84] M. Panasiuk, M. Rychłowski, N. Derewońko, and K. Bieńkowska-Szewczyk, "Tunneling Nanotubes as a Novel Route of Cell-to-Cell Spread of Herpesviruses," *J. Virol.*, vol. 92, no. 10, pp. 1–17, 2018.
- [85] P. D. Arkwright *et al.*, "Fas stimulation of T lymphocytes promotes rapid intercellular exchange of death signals via membrane nanotubes," *Cell Res.*, vol. 20, no. 1, pp. 72–88, 2010.
- [86] B. Önfelt, S. Nedvetzki, K. Yanagi, and D. M. Davis, "Cutting Edge: Membrane Nanotubes Connect Immune Cells," *J. Immunol.*, vol. 173, no. 3, pp. 1511–1513, 2004.
- [87] B. Önfelt *et al.*, "Structurally Distinct Membrane Nanotubes between Human Macrophages Support Long-Distance Vesicular Traffic or Surfing of Bacteria," *J. Immunol.*, vol. 177, no. 12, pp. 8476–8483, 2006.
- [88] M. W. Austefjord, H. H. Gerdes, and X. Wang, "Tunneling nanotubes: Diversity in morphology and structure," *Commun. Integr. Biol.*, vol. 7, no. 2, 2014.
- [89] N. V. Bukoreshtliev, X. Wang, E. Hodneland, S. Gurke, J. F. V. Barroso, and H. H. Gerdes, "Selective block of tunneling nanotube (TNT) formation inhibits intercellular organelle transfer between PC12 cells," *FEBS Lett.*, vol. 583, no. 9, pp. 1481–1488, 2009.
- [90] M. Dupont, S. Souriant, G. Lugo-Villarino, I. Maridonneau-Parini, and C. Vélollet, "Tunneling nanotubes: Intimate communication between myeloid cells," *Front. Immunol.*, vol. 9, no. JAN, pp. 1–6, 2018.

- [91] S. Abounit and C. Zurzolo, "Wiring through tunneling nanotubes - from electrical signals to organelle transfer," *J. Cell Sci.*, vol. 125, no. 5, pp. 1089–1098, 2012.
- [92] H. H. Gerdes, N. V. Bukoreshtliev, and J. F. V. Barroso, "Tunneling nanotubes: A new route for the exchange of components between animal cells," *FEBS Lett.*, vol. 581, no. 11, pp. 2194–2201, 2007.
- [93] C. Schiller, J. E. Huber, K. N. Diakopoulos, and E. H. Weiss, "Tunneling nanotubes enable intercellular transfer of MHC class I molecules," *Hum. Immunol.*, vol. 74, no. 4, pp. 412–416, 2013.
- [94] K. Hase *et al.*, "M-Sec promotes membrane nanotube formation by interacting with Ral and the exocyst complex," *Nat. Cell Biol.*, vol. 11, no. 12, pp. 1427–1432, 2009.
- [95] A. Chauveau, A. Aucher, P. Eissmann, E. Vivier, and D. M. Davis, "Membrane nanotubes facilitate long-distance interactions between natural killer cells and target cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 12, pp. 5545–5550, 2010.
- [96] X. Wang, M. L. Veruki, N. V. Bukoreshtliev, E. Hartveit, and H. H. Gerdes, "Animal cells connected by nanotubes can be electrically coupled through interposed gap-junction channels," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 40, pp. 17194–17199, 2010.
- [97] S. Kimura, K. Hase, and H. Ohno, "The molecular basis of induction and formation of tunneling nanotubes," *Cell Tissue Res.*, vol. 352, no. 1, pp. 67–76, 2013.
- [98] D. S. Nikolic *et al.*, "HIV-1 activates Cdc42 and induces membrane extensions in immature dendritic cells to facilitate cell-to-cell virus propagation," *Blood*, vol. 118, no. 18, pp. 4841–4852, 2011.
- [99] Y. Wang, J. Cui, X. Sun, and Y. Zhang, "Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation," *Cell Death Differ.*, vol. 18, no. 4, pp. 732–742, 2011.
- [100] S. Desir *et al.*, "Tunneling nanotube formation is stimulated by hypoxia in ovarian cancer cells," *Oncotarget*, vol. 7, no. 28, pp. 43150–43161, 2016.
- [101] E. Lou *et al.*, "Tunneling nanotubes provide a unique conduit for intercellular transfer of cellular contents in human malignant pleural mesothelioma," *PLoS One*, vol. 7, no. 3, pp. 1–11, 2012.
- [102] S. Desir *et al.*, "Chemotherapy-Induced Tunneling Nanotubes Mediate Intercellular Drug Efflux in Pancreatic Cancer," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–13, 2018.
- [103] Y. M. Yamashita, M. Inaba, and M. Buszczak, "Specialized Intercellular Communications via Cytonemes and Nanotubes," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 34, no. 1, pp. 59–84, 2018.
- [104] J. Lu *et al.*, "Tunneling nanotubes promote intercellular mitochondria transfer followed by increased invasiveness in bladder cancer cells," *Oncotarget*, vol. 8, no. 9, pp. 15539–15552, 2017.
- [105] Y. Connor *et al.*, "Physical nanoscale conduit-mediated communication between tumour cells and the endothelium modulates endothelial phenotype," *Nat. Commun.*, vol. 6, 2015.
- [106] J. Pasquier *et al.*, "Tunneling nanotubes mediate preferential transfer of mitochondria from endothelial to cancer cells and confer chemoresistance," *Qatar Found. Annu. Res. Forum Proc.*, no. 2012, p. BMP88, 2012.
- [107] M. D. Kolba *et al.*, "Tunneling nanotube-mediated intercellular vesicle and protein transfer in the stroma-provided imatinib resistance in chronic myeloid leukemia cells," *Cell Death Dis.*, vol. 10, no. 11, 2019.
- [108] J. Wang *et al.*, "Cell adhesion-mediated mitochondria transfer contributes to mesenchymal stem cell-induced chemoresistance on T cell acute lymphoblastic leukemia cells," *J. Hematol. Oncol.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–13, 2018.
- [109] M. Costanzo *et al.*, "Transfer of polyglutamine aggregates in neuronal cells occurs in tunneling nanotubes," *J. Cell Sci.*, vol. 126, no. 16, pp. 3678–3685, 2013.
- [110] S. Abounit *et al.*, "Tunneling nanotubes spread fibrillar α -synuclein by intercellular trafficking of lysosomes," *EMBO J.*, vol. 35, no. 19, pp. 2120–2138, 2016.
- [111] M. Tardivel *et al.*, "Tunneling nanotube (TNT)-mediated neuron-to-neuron transfer of pathological Tau protein assemblies," *Acta Neuropathol. Commun.*, vol. 4, no. 1, p. 117, 2016.
- [112] L. Guo *et al.*, "Tunneling Nanotubular Expressways for Ultrafast and Accurate M1

- Macrophage Delivery of Anticancer Drugs to Metastatic Ovarian Carcinoma,” *ACS Nano*, 2019.
- [113] J. Ady *et al.*, “Tunneling nanotubes: An alternate route for propagation of the bystander effect following oncolytic viral infection,” *Mol. Ther. - Oncolytics*, vol. 3, no. September, p. 16029, 2016.
 - [114] A. Dilsizoglu Senol *et al.*, “Effect of tolytoxin on tunneling nanotube formation and function,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–15, 2019.
 - [115] S. El Andaloussi, I. Mäger, X. O. Breakefield, and M. J. A. Wood, “Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 12, no. 5, pp. 347–357, 2013.
 - [116] P. Wolf, “The nature and significance of platelet products in human plasma,” *Br. J. Haematol.*, vol. 13, no. 3, pp. 269–288, 1967.
 - [117] N. Chaput and C. Théry, “Exosomes: Immune properties and potential clinical implementations,” *Semin. Immunopathol.*, vol. 33, no. 5, pp. 419–440, 2011.
 - [118] S. Keller, J. Ridinger, A. K. Rupp, J. W. G. Janssen, and P. Altevogt, “Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics,” *J. Transl. Med.*, vol. 9, pp. 1–9, 2011.
 - [119] H. Kalra, G. P. C. Drummen, and S. Mathivanan, “Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 2, 2016.
 - [120] L. Burnier, P. Fontana, B. R. Kwak, and A. S. Anne, “Cell-derived microparticles in haemostasis and vascular medicine,” *Thromb. Haemost.*, vol. 101, no. 3, pp. 439–451, 2009.
 - [121] M. Simons and G. Raposo, “Exosomes - vesicular carriers for intercellular communication,” *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 21, no. 4, pp. 575–581, 2009.
 - [122] A. Bobrie, M. Colombo, G. Raposo, and C. Théry, “Exosome Secretion: Molecular Mechanisms and Roles in Immune Responses,” *Traffic*, vol. 12, no. 12, pp. 1659–1668, 2011.
 - [123] D. M. Pegtel and S. J. Gould, “Exosomes,” 2019.
 - [124] R. Kalluri and V. S. LeBleu, “The biology, function, and biomedical applications of exosomes,” *Science (80-.)*, vol. 367, no. 6478, 2020.
 - [125] M. Van Engeland, L. J. W. Nieland, F. C. S. Ramaekers, B. Schutte, and C. P. M. Reutelingsperger, “Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure,” *Cytometry*, vol. 31, no. 1, pp. 1–9, 1998.
 - [126] L. A. Mulcahy, R. C. Pink, and D. R. F. Carter, “Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake,” *J. Extracell. Vesicles*, vol. 3, no. 1, 2014.
 - [127] W. Fitzgerald, M. L. Freeman, M. M. Lederman, E. Vasilieva, R. Romero, and L. Margolis, “A System of Cytokines Encapsulated in ExtraCellular Vesicles,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–11, 2018.
 - [128] N. Iraci, T. Leonardi, F. Gessler, B. Vega, and S. Pluchino, “Focus on extracellular vesicles: Physiological role and signalling properties of extracellular membrane vesicles,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 2, 2016.
 - [129] L. Margolis and Y. Sadovsky, “The biology of extracellular vesicles: The known unknowns,” *PLoS Biol.*, vol. 17, no. 7, pp. 1–12, 2019.
 - [130] R. B. Donker *et al.*, “The expression profile of C19MC microRNAs in primary human trophoblast cells and exosomes,” *Mol. Hum. Reprod.*, vol. 18, no. 8, pp. 417–424, 2012.
 - [131] S. Mathivanan, H. Ji, and R. J. Simpson, “Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication,” *J. Proteomics*, vol. 73, no. 10, pp. 1907–1920, 2010.
 - [132] S. Horibe, T. Tanahashi, S. Kawauchi, Y. Murakami, and Y. Rikitake, “Mechanism of recipient cell-dependent differences in exosome uptake,” *BMC Cancer*, vol. 18, no. 1, pp. 1–9, 2018.
 - [133] H. Valadi, K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J. J. Lee, and J. O. Lötvall, “Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, no. 6, pp. 654–659, 2007.
 - [134] E. Ogorevc, V. Kralj-Iglic, and P. Veranic, “The role of extracellular vesicles in phenotypic cancer transformation,” *Radiol. Oncol.*, vol. 47, no. 3, pp. 197–205, 2013.

- [135] J. Ratajczak *et al.*, “Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery,” *Leukemia*, vol. 20, no. 5, pp. 847–856, 2006.
- [136] S. Gatti *et al.*, “Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury,” *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 26, no. 5, pp. 1474–1483, 2011.
- [137] I. Del Conde, C. N. Shrimpton, P. Thiagarajan, and J. A. López, “Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation,” *Blood*, vol. 106, no. 5, pp. 1604–1611, 2005.
- [138] G. Lachenal *et al.*, “Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity,” *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 46, no. 2, pp. 409–418, 2011.
- [139] M. Chivet, F. Hemming, K. Pernet-Gallay, S. Fraboulet, and R. Sadoul, “Emerging role of neuronal exosomes in the central nervous system,” *Front. Physiol.*, vol. 3 MAY, no. May, pp. 1–6, 2012.
- [140] G. Raoso *et al.*, “B Lymphocytes Secrete Antigen-presenting Vesicles,” *J. Exp. Med.*, vol. 183, pp. 1161–1172, 1996.
- [141] J. Wolfers *et al.*, “Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming,” *Nat. Med.*, vol. 7, no. 3, pp. 297–303, 2001.
- [142] J. D. Walker, C. L. Maier, and J. S. Pober, “Cytomegalovirus-Infected Human Endothelial Cells Can Stimulate Allogeneic CD4 + Memory T Cells by Releasing Antigenic Exosomes,” *J. Immunol.*, vol. 182, no. 3, pp. 1548–1559, 2009.
- [143] C. Théry, L. Duban, E. Segura, P. Væron, O. Lantz, and S. Amigorena, “Indirect activation of naïve CD4⁺ T cells by dendritic cell-derived exosomes,” *Nat. Immunol.*, vol. 3, no. 12, pp. 1156–1162, 2002.
- [144] S. Bhatnagar and J. S. Schorey, “Exosomes released from infected macrophages contain Mycobacterium avium glycopeptidolipids and are proinflammatory,” *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 35, pp. 25779–25789, 2007.
- [145] M. Mack *et al.*, “Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: A mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection,” *Nat. Med.*, vol. 6, no. 7, pp. 769–775, 2000.
- [146] S. A. Bellingham, B. B. Guo, B. M. Coleman, and A. F. Hill, “Exosomes: Vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases?,” *Front. Physiol.*, vol. 3 MAY, no. May, pp. 1–13, 2012.
- [147] E. Emmanouilidou *et al.*, “Cell-produced α -synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival,” *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 20, pp. 6838–6851, 2010.
- [148] J. Vella, R. Sharples, V. Lawson, C. Masters, R. Cappai, and A. Hill, “Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing,” *J. Pathol.*, vol. 211, pp. 582–590, 2007.
- [149] R. C. Lai, T. S. Chen, and S. K. Lim, “Mesenchymal stem cell exosome: A novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease,” *Regen. Med.*, vol. 6, no. 4, pp. 481–492, 2011.
- [150] Z. Laurence *et al.*, “Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes,” *Nat. Med.*, vol. 4, no. 5, pp. 594–600, 1998.
- [151] Y. Zhang, Y. Liu, H. Liu, and W. H. Tang, “Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential,” *Cell Biosci.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–18, 2019.
- [152] M. Hadla *et al.*, “Exosomes increase the therapeutic index of doxorubicin in breast and ovarian cancer mouse models,” *Nanomedicine*, vol. 11, no. 18, pp. 2431–2441, 2016.
- [153] M. S. Kim *et al.*, “Development of exosome-encapsulated paclitaxel to overcome MDR in cancer cells,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 12, no. 3, pp. 655–664, 2016.
- [154] S. Gurunathan, M. Kang, M. Jeyaraj, M. Qasim, and J. Kim, “Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes,” *Cells*, vol. 8, no. 4, p. 307, 2019.
- [155] T. Kalwarczyk *et al.*, “Apparent Anomalous Diffusion in the Cytoplasm of Human Cells: The Effect of Probes’ Polydispersity,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 121, no. 42, pp. 9831–9837,

- 2017.
- [156] T. Kalwarczyk, N. Zie, and C. S. Wyszy, "Comparitive Analysis of viscosity of complex liquids and cytoplasm of mammalian cell at the nanoscale," pp. 2157–2163, 2011.
 - [157] K. A. Ahmed and J. Xiang, "Mechanisms of cellular communication through intercellular protein transfer," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 15, no. 7, pp. 1458–1473, 2011.
 - [158] B. De Rooij, R. Polak, F. Stalpers, R. Pieters, and M. L. Den Boer, "Tunneling nanotubes facilitate autophagosome transfer in the leukemic niche," *Leukemia*, vol. 31, no. 7, pp. 1651–1654, 2017.
 - [159] R. Polak, B. De Rooij, R. Pieters, and M. L. Den Boer, "B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells use tunneling nanotubes to orchestrate their microenvironment," *Blood*, vol. 126, no. 21, pp. 2404–2414, 2015.
 - [160] R. Pergu, S. Dagar, H. Kumar, R. Kumar, J. Bhattacharya, and S. V. S. Mylavaram, "The chaperone ERp29 is required for tunneling nanotube formation by stabilizing MSec," *J. Biol. Chem.*, vol. 294, no. 18, pp. 7177–7193, 2019.
 - [161] S. Kimura *et al.*, "Distinct Roles for the N-and C-terminal Regions of M-Sec in Plasma Membrane Deformation during Tunneling Nanotube Formation," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. August, pp. 1–7, 2016.
 - [162] M. Sari *et al.*, "Estimating the prevalence of anaemia: A comparison of three methods," *Bull. World Health Organ.*, vol. 79, no. 6, pp. 506–511, 2001.
 - [163] S. K. Moestrup and H. J. Moller, "CD163: A regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response," *Ann. Med.*, vol. 36, no. 5, pp. 347–354, 2004.
 - [164] M. R. Langlois and J. R. Delanghe, "Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans," *Clin. Chem.*, vol. 42, no. 10, pp. 1589–1600, 1996.
 - [165] J. L. Leclerc *et al.*, "The absence of the CD163 receptor has distinct temporal influences on intracerebral hemorrhage outcomes," *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 38, no. 2, pp. 262–273, 2018.
 - [166] J. Gburek *et al.*, "Hemoglobin - A novel ligand of hepatocyte Ectopic F1-ATPase," *J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 66, no. 6, pp. 823–830, 2015.
 - [167] J. Gburek *et al.*, "Megalin and cubilin are endocytic receptors involved in renal clearance of hemoglobin," *J Am Soc Nephrol*, vol. 13, no. 2, pp. 423–430, 2002.
 - [168] A. Etzerodt and S. K. Moestrup, "CD163 and Inflammation: Biological, Diagnostic, and Therapeutic Aspects," *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 18, no. 17, pp. 2352–2363, 2013.
 - [169] J. Si, S. Shao, Y. Shen, and K. Wang, "Macrophages as Active Nanocarriers for Targeted Early and Adjuvant Cancer Chemotherapy," *Small*, vol. 12, no. 37, pp. 5108–5119, 2016.
 - [170] S. K. Baek, A. R. Makkouk, T. Krasieva, C. H. Sun, S. J. Madsen, and H. Hirschberg, "Photothermal treatment of glioma; An in vitro study of macrophage-mediated delivery of gold nanoshells," *J. Neurooncol.*, vol. 104, no. 2, pp. 439–448, 2011.
 - [171] M. Muthana *et al.*, "Use of macrophages to target therapeutic adenovirus to human prostate tumors," *Cancer Res.*, vol. 71, no. 5, pp. 1805–1815, 2011.
 - [172] S. Li *et al.*, "Nanomedicine engulfed by macrophages for targeted tumor therapy," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 11, pp. 4107–4124, 2016.
 - [173] M. Bialasek *et al.*, "Exploiting iron-binding proteins for drug delivery," *J. Physiol. Pharmacol.*, vol. 70, no. 5, pp. 675–685, 2019.
 - [174] S. Brookes, P. Biessels, N. F. L. Ng, C. Woods, D. N. Bell, and G. Adamson, "Synthesis and characterization of a hemoglobin-ribavirin conjugate for targeted drug delivery," *Bioconjug. Chem.*, vol. 17, no. 2, pp. 530–537, 2006.
 - [175] A. Ghanekar *et al.*, "Targeted delivery of ribavirin improves outcome of murine viral fulminant hepatitis via enhanced anti-viral activity," *Hepatology*, vol. 43, no. 3, pp. 581–591, 2006.
 - [176] Z. Meng *et al.*, "Replacing heme with paclitaxel to prepare drug-loaded globin nanoassemblies for CD163 targeting," *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 3, pp. 1045–1055, 2015.
 - [177] X. Yuan *et al.*, "Hypoxic tumor therapy by hemoglobin-mediated drug delivery and reversal of hypoxia-induced chemoresistance," *Biomaterials*, vol. 182, pp. 145–156, 2018.
 - [178] N. Zhang and A. F. Palmer, "Development of a dichloroacetic acid-hemoglobin conjugate

- as a potential targeted anti-cancer therapeutic,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 108, no. 6, pp. 1413–1420, 2011.
- [179] N. Zhang and A. F. Palmer, “Liposomes surface conjugated with human hemoglobin target delivery to macrophages,” *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 109, no. 3, pp. 823–829, 2012.
 - [180] K. Kwapiszewska *et al.*, “Determination of oligomerization state of Drp1 protein in living cells at nanomolar concentrations,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–9, 2019.
 - [181] Y. X. Huang, Z. J. Wu, B. T. Huang, and M. Luo, “Pathway and mechanism of pH dependent human hemoglobin tetramer-dimer- monomer dissociations,” *PLoS One*, vol. 8, no. 11, pp. 1–9, 2013.
 - [182] M. Catalano and L. O’Driscoll, “Inhibiting extracellular vesicles formation and release: a review of EV inhibitors,” *J. Extracell. Vesicles*, vol. 9, no. 1, 2020.
 - [183] V. Thayanithy *et al.*, “A transwell assay that excludes exosomes for assessment of tunneling nanotube-mediated intercellular communication,” *Cell Commun. Signal.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–16, 2017.
 - [184] A. Mehdiani, A. Maier, A. Pinto, M. Barth, P. Akhyari, and A. Lichtenberg, “An innovative method for exosome quantification and size measurement,” *J. Vis. Exp.*, no. 95, pp. 1–9, 2015.
 - [185] F. Momen-Heravi *et al.*, “Alternative methods for characterization of extracellular vesicles,” *Front. Physiol.*, vol. 3 SEP, no. September, pp. 1–8, 2012.
 - [186] G. Raposo and W. Stoorvogel, “Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends,” *J. Cell Biol.*, vol. 200, no. 4, pp. 373–383, 2013.
 - [187] S. Khan, J. M. S. Jutzy, J. R. Aspe, D. W. McGregor, J. W. Neidigh, and N. R. Wall, “Survivin is released from cancer cells via exosomes,” *Apoptosis*, vol. 16, no. 1, pp. 1–12, 2011.
 - [188] A. E. Morelli *et al.*, “Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells,” *Blood*, vol. 104, no. 10, pp. 3257–3266, 2004.
 - [189] D. Feng *et al.*, “Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis,” *Traffic*, vol. 11, no. 5, pp. 675–687, 2010.
 - [190] K. J. Svensson *et al.*, “Exosome uptake depends on ERK1/2-heat shock protein 27 signaling and lipid raft-mediated endocytosis negatively regulated by caveolin-1,” *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 24, pp. 17713–17724, 2013.
 - [191] H. Cai, K. Reinisch, and S. Ferro-Novick, “Coats, Tethers, Rabs, and SNAREs Work Together to Mediate the Intracellular Destination of a Transport Vesicle,” *Dev. Cell*, vol. 12, no. 5, pp. 671–682, 2007.
 - [192] K. E. Keller, J. M. Bradley, Y. Y. Sun, Y. F. Yang, and T. S. Acott, “Tunneling nanotubes are novel cellular structures that communicate signals between trabecular meshwork cells,” *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 58, no. 12, pp. 5298–5307, 2017.
 - [193] A. Savina, M. Furlán, M. Vidal, and M. I. Colombo, “Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells,” *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 22, pp. 20083–20090, 2003.
 - [194] A. Zomer, T. Vendrig, E. S. Hopmans, M. van Eijndhoven, J. M. Middeldorp, and D. M. Pegtel, “Exosomes,” *Commun. Integr. Biol.*, vol. 3, no. 5, pp. 447–450, 2010.
 - [195] J. M. Gudbergsson, K. B. Johnsen, M. N. Skov, and M. Duroux, “Systematic review of factors influencing extracellular vesicle yield from cell cultures,” *Cytotechnology*, vol. 68, no. 4, pp. 579–592, 2016.
 - [196] J. Li *et al.*, “Serum-free culture alters the quantity and protein composition of neuroblastoma-derived extracellular vesicles,” *J. Extracell. Vesicles*, vol. 4, no. 2015, pp. 1–12, 2015.
 - [197] M. Nairz, I. Theurl, F. K. Swirski, and G. Weiss, “‘Pumping iron’—how macrophages handle iron at the systemic, microenvironmental, and cellular levels,” *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 469, no. 3–4, pp. 397–418, 2017.
 - [198] S. Lou, G. MacLaren, D. Best, C. Delzoppo, and W. Butt, “Hemolysis in pediatric patients receiving centrifugal-pump extracorporeal membrane oxygenation: Prevalence, risk factors, and outcomes,” *Crit. Care Med.*, vol. 42, no. 5, pp. 1213–1220, 2014.
 - [199] D. R. Janz *et al.*, “Association between cell-free hemoglobin, acetaminophen, and

- mortality in patients with sepsis: An observational study,” *Crit. Care Med.*, vol. 41, no. 3, pp. 784–790, 2013.
- [200] S. Waldvogel-Abramowski *et al.*, “Physiology of iron metabolism,” *Transfus. Med. Hemotherapy*, vol. 41, no. 3, pp. 213–221, 2014.
- [201] T. Ganz, “Review Macrophages and Iron Metabolism,” *Immunity*, vol. 44, no. 3, pp. 492–504, 2016.
- [202] J. G. Quigley *et al.*, “Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis,” *Cell*, vol. 118, no. 6, pp. 757–766, 2004.
- [203] L. A. Cohen *et al.*, “Serum ferritin is derived primarily from macrophages through a nonclassical secretory pathway,” *Blood*, vol. 116, no. 9, pp. 1574–1584, 2010.
- [204] P. Pradhan, V. Vijayan, F. Gueler, and S. Immenschuh, “Interplay of heme with macrophages in homeostasis and inflammation,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 3, 2020.
- [205] S. B. Keel *et al.*, “A Heme Export Protein Is Required for Red Blood Cell Differentiation and Iron Homeostasis,” *Science (80-.)*, vol. 506, no. July, pp. 825–829, 2008.
- [206] E. G. Meyron-Holtz, S. Moshe-Belizowski, and L. A. Cohen, “A possible role for secreted ferritin in tissue iron distribution,” *J. Neural Transm.*, vol. 118, no. 3, pp. 337–347, 2011.
- [207] X. M. Yuan, W. Li, S. K. Baird, M. Carlsson, and Ö. Melefors, “Secretion of ferritin by iron-laden macrophages and influence of lipoproteins,” *Free Radic. Res.*, vol. 38, no. 10, pp. 1133–1142, 2004.
- [208] M. Truman-Rosentsvit *et al.*, “Ferritin is secreted via 2 distinct nonclassical vesicular pathways,” *Blood*, vol. 131, no. 3, pp. 342–352, 2018.
- [209] J. -C Sibille, H. Kondo, and P. Aisen, “Interactions between isolated hepatocytes and kupffer cells in iron metabolism: A possible role for ferritin as an iron carrier protein,” *Hepatology*, vol. 8, no. 2, pp. 296–301, 1988.
- [210] D. L. Schonberg and D. M. McTigue, “Iron is essential for oligodendrocyte genesis following intraspinal macrophage activation,” *Exp. Neurol.*, vol. 218, no. 1, pp. 64–74, 2009.
- [211] D. L. Schonberg, E. Z. Goldstein, F. R. Sahinkaya, P. Wei, P. G. Popovich, and D. M. McTigue, “Ferritin stimulates oligodendrocyte genesis in the adult spinal cord and can be transferred from macrophages to NG2 cells in vivo,” *J. Neurosci.*, vol. 32, no. 16, pp. 5374–5384, 2012.
- [212] C. Mukherjee and T. Kling, “Oligodendrocytes Provide Antioxidant Defense Function for Neurons by Secreting Ferritin Heavy Chain,” pp. 1–14, 2020.
- [213] S. J. Dixon *et al.*, “Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death,” *Cell*, vol. 149, no. 5, pp. 1060–1072, 2012.
- [214] X. Chen, C. Yu, R. Kang, and D. Tang, “Iron Metabolism in Ferroptosis,” *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 8, no. October, pp. 1–14, 2020.
- [215] Q. Li *et al.*, “Inhibition of neuronal ferroptosis protects hemorrhagic brain,” *JCI insight*, vol. 2, no. 7, p. e90777, 2017.