

UNIwersytet Medyczny w Białymstoku
Wydział Lekarski
z Oddziałem Stomatologii i Oddziałem Nauczania
w Języku Angielskim



ROZPRAWA DOKTORSKA

mgr Marlena Tynecka

**Bezpieczeństwo podawania i mechanizmy działania
mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki
tłuszczowej w eksperymentalnym modelu astmy**

Promotor pracy: dr hab. Andrzej Eljaszewicz

Zakład Medycyny Regeneracyjnej i Immunoregulacji
Kierownik: prof. dr hab. Marcin Moniuszko

Białystok, 2022

*Najserdeczniejsze podziękowania składam Promotorowi niniejszej pracy **dr hab. Andrzejowi Eljaszewiczowi** za nieocenioną pomoc w przygotowaniu pracy, wsparcie i zaszczepienie bakcyła naukowego.*

*Dziękuję również **Prof. dr hab. Marcinowi Moniuszce** za umożliwienie prowadzenia badań i za okazane wsparcie, a także **lic. Adrianowi Janucikowi i zespołowi Zakładu Medycyny Regeneracyjnej i Immunoregulacji** za pomoc w realizacji badań.*

*Szczególne podziękowania składam również **dr hab. Milenie Sokołowskiej i Prof. dr hab. Cezmiemu A. Akdisowi** za wskazanie nowych horyzontów naukowych i za wspaniałe przyjęcie mnie do rodziny naukowców *Swiss Institute of Allergy and Asthma Research*.*

Rodzinie, Arkowi, bliskim, przyjaciółom za obecność.

SPIS TREŚCI

I) LISTA PUBLIKACJI SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ	6
II) SPIS SKRÓTÓW	9
III) WSTĘP	11
1) Charakterystyka mezenchymalnych komórek macierzystych	11
2) Aktywności immunosupresyjne mezenchymalnych komórek macierzystych.....	12
3) Mechanizmy immunomodulacyjne zależne od bezpośrednich interakcji komórkowych (<i>ang. cell to cell contact-dependent</i>)	14
4) Mechanizmy immunomodulacyjne zależny od czynników rozpuszczalnych (<i>ang. soluble mediator-mediated mechanism</i>)	15
5) Wykorzystanie mezenchymalnych komórek macierzystych w regulacji zapalenia dolnych dróg oddechowych w astmie.....	16
IV) PRACA POGLĄDOWA WCHODZĄCA W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	20
V) CEL PRACY	38
VI) MATERIAŁY I METODY	39
1) Izolacja i hodowla mezenchymalnych komórek macierzystych.....	39
2) Cytometryczna ocena fenotypu mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z ludzkiej tkanki tłuszczowej	40
3) Potwierdzenie zdolności mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z ludzkiej tkanki tłuszczowej do różnicowania się <i>in vitro</i> w kierunku komórek linii mezodermalnej	41
4) Ocena immunosupresyjnych właściwości mezenchymalnych komórek macierzystych w warunkach <i>in vitro</i>	41
5) Modele mysie	44
6) Barwienia histochemiczne	47
7) Ocena preparatów histochemicznych.....	48
8) Cytometryczna ocena składu ilościowego i jakościowego populacji limfocytów efektorowych.....	49
9) Ocena ekspresji białek bariery epitelialnej metodą mikroskopii konfokalnej	50
10) Izolacja RNA i sekwencjonowanie nowej generacji (<i>ang. next generation sequencing, NGS</i>)	50
11) Analiza transkryptomyczna.....	51
12) Ocena ilościowa mediatorów stanu zapalnego w popłuczynach oskrzelowo- pęcherzykowych	51
V) WYNIKI	53
1) Podsumowanie opublikowanych wyników wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	53
VI) PRACA ORYGINALNA WCHODZĄCA W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	56
VII) NIEOPUBLIKOWANE DANE WŁĄCZONE DO ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	75
1) Potwierdzenie właściwości immunosupresyjnych MSC pochodzących z ludzkiej tkanki tłuszczowej w warunkach <i>in vitro</i>	75

2) Efekty przez nosowego podawania mezenchymalnych komórek macierzystych w eksperymentalnym modelu astmy indukowanym ekstraktem roztocza kurzu domowego	76
VIII) DYSKUSJA	85
IX) WNIOSKI	91
X) STRESZCZENIE POLSKIE	92
XI) STRESZCZENIE ANGLOJĘZyczne	95
XII) BIBLIOGRAFIA	97
XIII) ZGODY KOMISJI ETYCZNYCH NA PRZEPROWADZENIE DOŚWIADCZEŃ	109
XIV) INFORMACJA O CHARAKTERZE UDZIAŁU WSPÓŁAUTORÓW W PUBLIKACJACH WRAZ Z SZACUNKOWYM OKREŚLENIEM PROCENTOWEGO WKŁADU	112
XV) OŚWIADCZENIE O WDROŻENIOWOŚCI PROWADZONYCH BADAŃ	114

Niniejsza praca została sfinansowana z projektów:

1. „Strategia Doskonałości – Uczelnia Badawcza” w latach 2018 – 2019 projekt nr 0017/SDU/2018/18 kwota dofinansowania 690 000 zł finansowanego w ramach programu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego;
2. „Krajowe Międzysektorowe Studia Doktoranckie na Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku” współfinansowany przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020, nr POWR.03.02.00-00-I050/16.
3. Subwencji naukowych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku.

I) LISTA PUBLIKACJI SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

1) Praca pogładowa:

Tytuł: *Old friends with unexploited perspectives: current advances in mesenchymal stem cell-based therapies in asthma.*

Autorzy: Tynecka Marlena, Moniuszko Marcin, Eljaszewicz Andrzej.

Stem Cell Reviews and Reports, 2021

Impact Factor: 6,692; Punktacja MEiN: 100,000

Procentowy udział w pracy: 70%

Charakter udziału: Przegląd literatury, przygotowanie projektu manuskryptu, przygotowanie i opracowanie rycin oraz tabel

2) Praca oryginalna:

Tytuł: *The short-term and long-term effects of intranasal mesenchymal stem cell administration to noninflamed mice lung.*

Autorzy: Tynecka Marlena, Janucik Adrian, Niemira Magdalena, Żbikowski Arkadiusz, Stocker Nino, Tarasik Agnieszka, Starosz Aleksandra, Grubczak Kamil, Szalkowska Anna, Korotko Urszula, Reszeć Joanna, Kwaśniewski Mirosław, Krętowski Adam, Akdis Cezmi, Sokołowska Milena, Moniuszko Marcin, Eljaszewicz Andrzej.

Frontiers in Immunology, 2022

Impact Factor: 8,786; Punktacja MEiN: 140,000

Procentowy udział w pracy: 55%

Charakter udziału: Wiodąca rola w prowadzeniu badań, analiza i interpretacja danych, przygotowanie projektu manuskryptu

Osiągnięcia zostały podsumowane w Tabeli 1.

Tabela 1. Podsumowanie osiągnięć.

Rodzaj publikacji	Liczba	Impact Factor	Punktacja MEiN
Prace włączone do rozprawy doktorskiej	2	15,478	240,000
Prace, które nie zostały włączone do rozprawy doktorskiej	11	51,374	870,000
Streszczenia zjazdowe	44	-	-
- Autor prezentujący	16	-	-
- Współautor	28	-	-
Razem	57	66,852	1110,000

3) Pozostałe osiągnięcia:

- a) Kierownik grantu PRELUDIUM 19 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki pt. *„Zrozumienie immunosupresyjnego mechanizmu działania mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC) w eksperymentalnym modelu astmy neutrofilowej jako strategia identyfikacji nowych potencjalnych celów terapeutycznych”* (2020/37/N/NZ5/04144).
- b) Zwycięzca (wraz z zespołem Zakładu Medycyny Regeneracyjnej i Immunoregulacji) konkursu RundaT organizowanego przez Fundację Technotalenty z projektem pt. *„Makropotencjał mikropęcharzyków - optymalizacja pozyskiwania preparatu pochodzącego z mezenchymalnych komórek macierzystych jako potencjalnej strategii terapeutycznej w leczeniu przewlekłych chorób dróg oddechowych”*.
- c) Staże/ stypendia:
 - Swiss Institute of Allergy and Asthma Research (Milena Sokolowska PhD group), Davos, Switzerland (*International scholarship exchange of PhD candidates and academic staff, Polish National Agency for Academic Exchange*); 6- 30 września 2021;

- Stem Cell Institute, James Graham Brown Cancer Center, University of Louisville, Louisville, USA (Research Scholar, Prof. Mariusz Z. Ratajczak group); 6 listopada 2017- 31 maja 2018;
- Swiss Institute of Allergy and Asthma Research (Prof. Cezmi A. Akdis group), Davos, Switzerland (*High quality internship programmes at the Faculty of Pharmacy with the Division of Laboratory Medicine of Medical University of Białystok*); trainee; 1 maja- 1 sierpnia 2017.

II) SPIS SKRÓTÓW

APC (*ang. antigen presenting cell*)- komórka prezentująca antygen

APO-1- apolipoproteina 1

BCR (*ang. B cell receptor*)- receptor limfocytu B

BAL (*ang. bronchoalveolar lavage*) - popłuczyny oskrzelowo- pęcherzykowe

CCL (*ang. C-C motif chemokine*)- chemokina C-C

CD (*ang. cluster of differentiation*)- antygen różnicowania komórkowego

cDNA (*ang. complementary DNA*)- komplementarny DNA, komplementarny kwas deoksyrybonukleinowy

CXCR (*ang. CXC chemokine receptors*)- receptory chemokin CXC

DC (*ang. dendritic cell*)- komórka dendrytyczna

EVs (*ang. extracellular vesicles*) - pęcherzyki zewnątrzwydzielnicze

FABP4 (*ang. fatty acid binding protein 4*) – białko wiążące kwasy tłuszczowe 4

FAS/ FASL/ FASR- białko Fas, ligand Fas, receptor Fas

FBS (*ang. fetal bovine serum*) - bydlęca surowica płodowa

GAPDH (*ang. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) - dehydrogenaza aldehydu 3- fosfoglicerynowego

GKS- glikokortykosteroidy

HDM (*ang. house dust mite*) - roztocze kurzu domowego

HGF (*ang. hepatocyte growth factor*) - czynnik wzrostu hepatocytów

ICAM (*ang. intracellular adhesion molecule*) - międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna

ICOS/ICOSL (*ang. inducible costimulator/ inducible costimulator ligand*)- indukowany kostymulator/ ligand indukowanego kostymulatora

IDO- indolamina 2,3-dioksygenazy

IFN- interferon

Ig- immunoglobulina

IL- interleukina

ILC (*ang. innate lymphoid cell*)- wrodzona komórka limfoidalna

MHC (*ang. major histocompatibility complex*) - główny układ zgodności tkankowej

miR- mikroRNA

MMP (*ang. matrix metalloproteinase*) - metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej

MSC (*ang. mesenchymal stem cell*) - mezenchymalna komórka macierzysta

mTORC2 (*ang. mTOR Complex 2*)- kompleks mTORC 2

NGS (*ang. next generation sequencing*) – sekwencjonowanie nowej generacji

NO (*ang. nitric oxide*) - tlenek azotu

OVA, OVA-Alum (*ang. aluminum hydroxide (alum)-emulsified ovalbumin*)

qPCR (*ang. quantitative polymerase chain reaction*) - ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy

PAS (*ang. periodic acid Schiff stain*) - barwienie kwasem nadjodowym Schiffa

PD-1/ PD-L1 (*ang. programmed death ligand 1*) – receptor/ ligand programowanej śmierci komórkowej 1

PGE2- prostaglandyna E2

PI3K (*ang. phosphoinositide 3-kinase*)- kinaza 3-fosfoinozytydu

RNA- kwas rybonukleinowy

S1P3 (*ang. sphingosine-1-phosphate 3*)- sfinogozyno-1-fosforan 3

Th1, Th2, Th17 (*ang. T helper lymphocyte*)- limfocyt pomocniczy typu 1, 2 i 17

Treg (*ang. T regulatory lymphocyte*)- limfocyt T regulatorowy

TIMP (*ang. tissue inhibitor of metalloproteinase*)- tkankowy inhibitor metaloproteinazy

TNF (*ang. tumor necrosis factor*) - czynnik martwicy nowotworów

TSG6 (*ang. tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein, tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein*)

VCAM (*ang. vascular adhesion molecule*) - molekula adhezyjna komórki naczyniowej

ZO-1 (*ang. zonula occludens*) / TJP1 (*ang. tight junction protein 1*) – białko ścisłych połączeń komórkowych 1

III) WSTĘP

1) Charakterystyka mezenchymalnych komórek macierzystych

Mezenchymalne komórki macierzyste (*ang. mesenchymal stem cells, MSC*) są heterogenną populacją multipotencjalnych komórek stromalnych o morfologii zbliżonej do fibroblastów [1]. Pierwotnie, MSC zostały zidentyfikowane w szpiku kostnym [2], jednakże w kolejnych latach z powodzeniem izolowano je m.in. z tkanki tłuszczowej [3-5], galarety Whartona [6, 7], krwi pępowinowej [8, 9], błony i płynu owodniowego [10-12], miazgi zębowej [13], krwi obwodowej [14], gruczołów ślinowych [15] oraz płynu maziowego [16]. Ze względu na różnorodność źródeł pozyskiwania MSC i podobieństwo funkcjonalne tych komórek, Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej (*ang. International Society of Cellular Therapy*) zaproponowało minimalne kryteria pozwalające na scharakteryzowanie MSC izolowanych z różnych źródeł [11, 17, 18]. Zgodnie z zaproponowaną definicją MSC określa się jako komórki:

- a) przylegające do powierzchni plastikowych w hodowli (adherentne);
- b) charakteryzujące się ekspresją markerów powierzchniowych CD29, CD71, CD73, CD90, CD105, CD271, przy jednoczesnym braku ekspresji CD14, CD34, CD45, CD80, CD86 oraz głównego antygeny zgodności tkankowej typu II (*ang. major histocompatibility complex, MHCII*);
- c) posiadające zdolność do różnicowania się w kierunku komórek linii mezodermalnej, a mianowicie adipocytów, chondrocytów oraz osteocytów [1, 17].

Obecnie ze względu na mniej inwazyjne metody pobierania, MSC pochodzące ze szpiku kostnego są stopniowo zastępowane przez ich odpowiedniki pozyskiwane z tkanki tłuszczowej, galarety Whartona oraz krwi pępowinowej [7, 17, 18]. Jednakże, pomimo wielu podobieństw funkcjonalnych i morfologicznych pomiędzy komórkami izolowanymi z różnych źródeł tkankowych, ich właściwości immunosupresyjne i regeneracyjne oraz zdolność do proliferacji

i różnicowania mogą nieznacznie się różnić [3, 7, 18]. Dostępne dane wskazują, iż MSC pochodzące z tkanki tłuszczowej wykazują porównywalny potencjał immunomodulacyjny do ich szpikowych odpowiedników [3, 7, 18]. Wykorzystanie MSC pochodzących z tkanki tłuszczowej przy odpowiedniej standaryzacji protokołu ich pozyskiwania oraz przechowywania może pomóc w opracowaniu nowych strategii terapeutycznych, bądź wskazania nowych punktów uchwytu terapeutycznego w przewlekłych chorobach o podłożu zapalnym, w tym również astmie. Niestety, niewystarczające poznanie mechanizmów immunosupresyjnego działania MSC oraz długoterminowych efektów podawania tych komórek znacząco utrudnia opracowanie efektywnej terapii komórkowej [17].

2) Aktywności immunosupresyjne mezenchymalnych komórek macierzystych

Właściwości immunosupresyjne MSC aktywowane są poprzez stymulację mediatorami stanu zapalnego lub przy niedoborze tlenu (w warunkach hipoksji), zależą zatem od warunków mikrośrodowiska w jakim komórki te się znajdują *in vivo* lub sposobu w jakim zostaną one stymulowane *in vitro* [19-22]. Proces przygotowania MSC prowadzący do aktywacji ich właściwości immunosupresyjnych jest określany z języka angielskiego jako *priming*, *licensing* lub *preconditioning* [19]. Immunosupresyjność MSC nie jest zatem konstytutywną cechą tych komórek, ale podlega regulacji w lokalnym mikrośrodowisku tkanki biorecy, a więc może też zależeć od stadium choroby, a także czasu oraz drogi podania komórek [19, 23]. Aktualnie najlepiej opisanymi mediatorami indukującymi aktywności przeciwzapalne MSC są interleukina (IL)-1 α/β , interferon (IFN) γ oraz czynnik martwicy nowotworu α (*ang. tumor necrosis factor*, TNF α) [19].

Wydaje się, iż opisywane w literaturze niepowodzenia związane z osiągnięciem pożądanego efektu terapeutycznego po podaniu MSC w chorobach o podłożu zapalnym mogą wynikać z ich nieodpowiedniego przygotowania tzn. aktywacji ich właściwości immunosupresyjnych [19]. Dlatego coraz częściej podejmowane są próby opracowywania

strategii umożliwiającym zwiększenie potencjału terapeutycznego MSC poprzez ich stymulację *in vitro* białkami rekombinowanymi, środkami farmakologicznymi i chemicznymi np. kwasem walproinowym i retinowym [19].

Dotychczas opisane immunoregulacyjne aktywności MSC obejmują:

- a) osłabienie proliferacji limfocytów T pomocniczych CD4⁺ oraz cytotoksycznych CD8⁺ [24];
- b) zahamowanie dojrzewania monocytów i komórek CD34⁺ w kierunku prozapalnych makrofagów oraz komórek dendrytycznych (*ang. dendritic cell, DC*) [8];
- c) zwiększenie rekrutacji limfocytów T regulatorowych (Treg) oraz plastyczności limfocytów T efektorowych [22, 25];
- d) ograniczenie cytotoksyczności i proliferacji komórek NK (*ang. natural killer cells*) [26, 27];
- e) zahamowanie dojrzewania limfocytów B i produkcji przeciwciał [28].

Aktywowane MSC mogą regulować odpowiedź immunologiczną na drodze mechanizmu zależnego od bezpośrednich interakcji między komórkami (ligand-receptor) i/ lub pośredniego, zależnego od wydzielania czynników rozpuszczalnych (sekretom) [17, 29-31]. Wydaje się, iż osiągnięcie optymalnego efektu immunosupresyjnego działania MSC wymaga jednoczesnej aktywacji obu mechanizmów [17]. Ponadto, wskazuje się, iż zaangażowanie bezpośrednich oddziaływań komórkowych poprzez białka adhezyjne VCAM-1 (*ang. vascular endothelial adhesion molecule 1*) oraz ICAM-1 (*ang. intracellular adhesion molecule 1*) może wzmacniać działanie mechanizmu zależnego od sekrecji rozpuszczalnych czynników, a mianowicie: prostaglandyny E2 (PGE2), tlenku azotu (NO), cytokin (IL-2, IL-10 i TSG-6) i indolaminy 2,3-dioksygenazy (IDO) [22, 32-35]. Bezpośrednie interakcje międzykomórkowe wydają się być szczególnie istotne w przypadku regulacji aktywności limfocytów T efektorowych oraz indukcji ich plastyczności [22, 28, 30, 36].

3) Mechanizmy immunomodulacyjne zależne od bezpośrednich interakcji komórkowych (*ang. cell to cell contact-dependent*)

Immunomodulacyjne aktywności MSC związane z bezpośrednią interakcją z komórkami układu immunologicznego są dość słabo opisane, a większość dostępnych danych pochodzi z badań *in vitro*. Doniesienia te wskazują jednoznacznie na kluczowe znaczenie stymulacji zależnej od IFN γ w procesie indukcji ekspresji receptorów powierzchniowych zdolnych do wywierania efektu modulującego funkcje efektorowe limfocytów T. Inkubacja MSC w obecności IFN γ powoduje podwyższenie ekspresji białek stanowiących tzw. punkty kontroli odpowiedzi immunologicznej (molekuł kostymulujących), a mianowicie ligandu receptora programowej śmierci 1 i 2 (*ang. programmed death-ligand 1 and 2*, PD-L1, PD-L2) [22, 29, 32, 37]. Obie molekuly mogą wchodzić w interakcję z receptorem PD-1 na limfocytach T oraz B, co w konsekwencji hamuje ich aktywację, ogranicza proliferację, a także indukuje anergię co może prowadzić do apoptozy aktywowanych limfocytów T. Z drugiej strony, interakcja PD-L1/PD-1 ogranicza różnicowanie limfocytów T w kierunku silnie prozapalnej subpopulacji Th17 (*ang. T helper lymphocytes*) [29, 30, 37, 38]. Dodatkowo, interakcja pomiędzy indukowanym kostymulatorem, a jego ligandem (*ang. inducible costimulator-inducible costimulator ligand*, ICOS-ICOSL) sprzyja różnicowaniu limfocytów T w kierunku Treg [39, 40]. Co ciekawe, MSC mogą również bezpośrednio modulować lokalną odpowiedź immunologiczną poprzez indukcję apoptozy komórek efektorowych. MSC wykazują ekspresję błonową ligandu białka FAS (FASL, CD95L). FASL jest transbłonową glikoproteiną typu II należąca do rodziny białek TNF. Poprzez interakcję z receptorem FAS (FASR, APO-1), który ulega ekspresji m.in. na powierzchni aktywowanych limfocytów T oraz B, może indukować ich apoptozę [41, 42].

4) Mechanizmy immunomodulacyjne zależny od czynników rozpuszczalnych

(ang. soluble mediator-mediated mechanism)

Aktywacja mechanizmów zależnych od wydzielania czynników rozpuszczalnych wymaga podobnie jak w przypadku mechanizmów bezpośrednich wcześniejszej stymulacji MSC przez czynniki prozapalne włączając w to m.in. IL-1 α/β , IFN γ , TNF α [17]. W obecności IFN γ , MSC zwiększają wydzielanieIDO, który metabolizując tryptofan prowadzi do akumulacji kynureniny, L-tryptofanu, kwasu kynureninowego, kwasu chinolinowego i kwasu antranilowego [35]. Ze wszystkich wyżej wymienionych metabolitów, jedynie kynurenina wykazuje aktywności immunomodulujące i ogranicza funkcje efektorowe limfocytów T oraz hamuje ich proliferację [35]. AktywnośćIDO wpływa również na komórki prezentujące antygen (*ang. antigen presenting cells, APCs*), poprzez indukcję różnicowania/dojrzenia monocytów w kierunku alternatywnie aktywowanych makrofagów (makrofagi o fenotypie M2) produkujących duże ilości IL-10 [43].

MSC mogą modulować odpowiedź układu immunologicznego nie tylko poprzez mechanizm zależny odIDO, ale również poprzez wydzielanie cytokin przeciwzapalnych, w tym głównie IL-10. Immunoregulacyjne działanie wydzielanej przez MSC IL-10 obejmuje ograniczenie produkcji cytokin przez limfocyty T subpopulacji Th1 i Th17 [25], indukcję tolerogennego fenotypu APC [44, 45], obniżenie wydzielania IL-1 α/β [46], IL-12p40 [47], IFN γ [48] i TNF α [46]. Dodatkowo, MSC mogą pośrednio zwiększać sekrecję IL-10 poprzez indukcję limfocytów Treg oraz jak już wspomniano makrofagów M2 [8, 43, 49].

Działanie immunosupresyjne MSC mogą być również wywierane na drodze komunikacji zależnej od pęcherzyków zewnątrzwydzielniczych (*ang. extracellular vesicles, EVs*) [50, 51]. EVs klasyfikowane są pod względem wielkości na:

a) egzosomy (endocytarne pęcherzyki o rozmiarze 30-150 nm),

b) mikropęcherzyki (pęcherzyki powstałe w wyniku oddzielania się od „pączkującej” błony o rozmiarze 100-1000 nm) oraz

c) ciała apoptotyczne (500-5000 nm) [50, 52, 53].

Niestety nadal nieznane jest znaczenie rozmiaru EVs w procesie immunomodulacji. Wiadomo natomiast, że pęcherzyki wydzielnicze transportują czynniki wzrostowe oraz cytokiny (TGF β , IL-6, IL-10 i HGF) [6, 27, 44, 54-56], enzymy (IDO) [57], mediatory lipidowe (PGE2) [58, 59], a także mikroRNA (miR-155, miR-146, miR-594) [60] i w ten sposób mogą wpływać na elementy komórkowej odpowiedzi pierwotnej i adaptacyjnej. Dlatego wydaje się, że preparaty zawierające pęcherzyki wydzielnicze MSC mogą stanowić interesującą alternatywę dla zastosowania całych komórek.

5) Wykorzystanie mezenchymalnych komórek macierzystych w regulacji zapalenia dolnych dróg oddechowych w astmie

Znaczący postęp w zrozumieniu patomechanizmu astmy pozwolił opisać procesy prowadzące do rozwoju zapalenia w obrębie dróg oddechowych. Najlepiej poznane są mechanizmy związane z rozwojem tzw. astmy Th2 zależnej (zapalenia *T2*, astmy eozynofilowej). Mechanizmy prowadzące do rozwoju tego endotypu astmy związane są z aktywacją limfocytów T subpopulacji Th2 oraz m.in. komórek tucznych, limfocytów B, komórek limfoidalnych odpowiedzi nieswoistej typu 2 (*ang. innate lymphoid cells, ILC2*) z kluczową rolą cytokin typu 2 (takich jak IL-4, IL-5, IL-13) oraz alarmin (TSLP, IL-25, IL-33) wydzielanych przez uszkodzony nabłonek dróg oddechowych [61-63]. Jednakże coraz częściej podkreśla się udział innych subpopulacji limfocytów T efektorowych, a mianowicie Th1, Th17, Th22 w odniesieniu do nadal słabiej poznanych endotypów astmy Th2 niezależnej (astmy *non-T2*, astmy neutrofilowej) lub endotypów mieszanych [64-68].

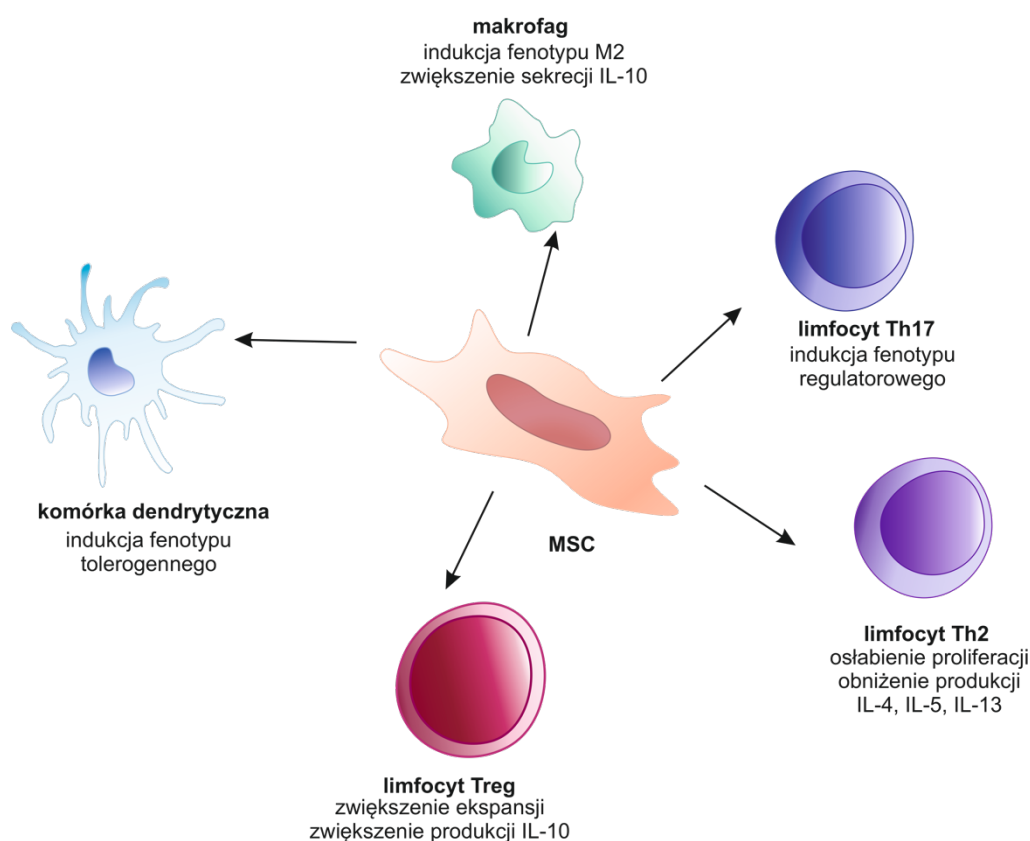
Obecnie, konwencjonalna terapia astmy opiera się na wykorzystaniu wziewnych lub systemowych glikokortykosteroidów (GKS). Terapia ta choć stanowi leczenie objawowe,

a nie przyczynowe jest niezwykle efektywna u większości pacjentów. Dodatkowo, wprowadzenie w ostatnich latach nowoczesnych terapii biologicznych, skierowanych przeciwko mediatorom zapalenia Th2 zależnego pozwoliło na optymalną kontrolę objawów astmy u przeważającej większości chorych [69-71]. Niestety, przewlekłe stosowanie stopniowo zwiększanych dawek GKS może prowadzić do rozwoju zjawiska oporności terapeutycznej. Natomiast, dostępne leczenie biologiczne zarezerwowane jest jedynie dla pacjentów z astmą T2 zależną, podczas gdy pacjenci cechujący się endotypem Th2 niezależnym nie odpowiadają na jej zastosowanie [69, 72, 73]. Należy podkreślić, że niekontrolowana lub suboptymalnie kontrolowana astma prowadzi do powstania nieodwracalnych zmian strukturalnych w obrębie płuc (nazywanych powszechnie remodelingiem), które powodują upośledzenie ich funkcji oddechowych. W związku z powyższym, wciąż poszukuje się nowych strategii umożliwiających efektywną kontrolę zapalenia u pacjentów nieodpowiadających na aktualnie dostępne formy leczenia.

Wykorzystanie immunosupresyjnych właściwości MSC wydaje się być obiecującą strategią umożliwiającą kontrolę zapalenia dolnych dróg oddechowych w przebiegu astmy. Z drugiej strony ich wykorzystanie w modelach przedklinicznych może pomóc zdefiniować nowe punkty uchwytu terapii celowanych bez konieczności wykorzystywania przeszczepów komórkowych [4, 17, 74-81].

Obiecujący potencjał terapeutyczny MSC w regulacji zapalenia dróg oddechowych został potwierdzony w wielu badaniach przedklinicznych, jednakże mechanizmy regulujące złożone interakcje MSC z komórkami immunologicznymi, komórkami strukturalnymi płuc, a także wydzielanymi przez nie czynnikami wzrostowymi, bioaktywnymi lipidami, cytokinami, chemokinami oraz enzymami nie zostały wystarczająco poznane [17, 19, 82]. Dotychczas opisane efekty immunosupresyjnego działania MSC obejmują ograniczenie reaktywności dróg oddechowych, infiltracji komórek układu immunologicznego, hiperplazję

komórek kubkowych oraz zwiększoną produkcję śluzu, ograniczenie produkcji cytokin Th2-zależnych (IL-4, IL-5, IL-13), a także obniżenie liczby limfocytów, neutrofilów i eozynofilów w BAL [4, 77, 81, 83-86]. Niestety, jak dotąd wskazano jedynie kilka procesów zaangażowanych w mechanizm immunoregulacyjnego działania MSC, a mianowicie: regulację równowagi pomiędzy limfocytami Treg/Th17 i ekspansję Treg [36, 87]; zahamowanie dojrzewania monocytów i komórek progenitorowych CD34+ w kierunku komórek dendrytycznych [77]; indukcję immunosupresyjnych makrofagów M2 [88]; a także bezpośrednią produkcję przeciwzapalnej IL-10 lub pośrednie zwiększenie jej sekrecji przez limfocyty Treg lub makrofagi typu M2 [74, 77, 89]. Efekty podania MSC w zapaleniu dróg oddechowych zostały podsumowane na Rycinie 1.



Rycina 1. Graficzne posumowanie znanych efektów działania MSC na komórki układu immunologicznego w zapaleniu dróg oddechowych. Th1/ Th2/ Th17 (*ang. T helper lymphocyte*) - subpopulacje limfocytów pomocniczych typu 1, 2 i 17; Treg (*ang. T regulatory lymphocyte*)- limfocyty T regulatorowe; IL- interleukina.

Szczegółowe podsumowanie dotychczas poznanych aktywności MSC, również w modelach eksperymentalnych astmy zostało przedstawione w pracy poglądowej

opublikowanej w *Stem Cell Reviews and Reports* (2021), która została załączona poniżej i stanowi integralną część niniejszej dysertacji.



Old Friends with Unexploited Perspectives: Current Advances in Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies in Asthma

Marlena Tynecka¹ · Marcin Moniuszko^{1,2} · Andrzej Eljaszewicz¹ Accepted: 10 February 2021 / Published online: 1 March 2021
© The Author(s) 2021

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) have a great regenerative and immunomodulatory potential that was successfully tested in numerous pre-clinical and clinical studies of various degenerative, hematological and inflammatory disorders. Over the last few decades, substantial immunoregulatory effects of MSC treatment were widely observed in different experimental models of asthma. Therefore, it is tempting to speculate that stem cell-based treatment could become an attractive means to better suppress asthmatic airway inflammation, especially in subjects resistant to currently available anti-inflammatory therapies. In this review, we discuss mechanisms accounting for potent immunosuppressive properties of MSCs and the rationale for their use in asthma. We describe in detail an intriguing interplay between MSCs and other crucial players in the immune system as well as lung microenvironment. Finally, we reveal the potential of MSCs in maintaining airway epithelial integrity and alleviating lung remodeling.

Keywords Mesenchymal stem cells · Asthma · Immune regulation · Experimental asthma · Stem cells

Introduction

Significant progress in our understanding of stem cell biology accompanied by development of technologies enabling the induction of pluripotency in somatic cells opened new ways to develop stem cell-based therapies for currently incurable diseases [1–5]. However, initial optimism was quickly disturbed by ethical dilemmas and significant safety issues. Apart from crucial ethical dilemmas concerning embryonic stem cells, the most controversial issues inhibiting the wider use of adult stem cells and induced pluripotent stem cells (iPCs) relate to their stability and long-term effects of their application [6–13]. In

fact, to date, only two stem cell-based therapies were approved by FDA (U.S. Food and Drug Administration) and EMA (European Medicines Agency). These are hematopoietic stem cell transplantation, available at: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products> [14] and limbal stem cell therapy used for corneal transplant vision recovery, available at: <https://www.ema.europa.eu/en/news/first-stem-cell-therapy-recommended-approval-eu> [15]. Other stem cell-based therapies are still tested in clinical trials or applied as medical experiments [16, 17]. Therefore, they still represent patients and medical professionals' unfulfilled dreams rather than a widely available therapeutic option.

This holds true for patients suffering from advanced inflammatory diseases [18–21], poorly healing injuries [22–24], and irreversible tissue/organ damage [25–28], including patients with advanced suboptimally controlled or even uncontrolled respiratory diseases such as acute respiratory distress syndrome (ARDS) [29], idiopathic pulmonary fibrosis [30] and severe persistent asthma with lung remodeling [31–36].

Inhaled corticosteroids (ICS) are the mainstay in asthma therapy as they effectively control symptoms and prevent exacerbations in the majority of patients. Asthmatic airway inflammation can be further alleviated by allergen-specific immunotherapy in allergic asthmatics and biological therapy in patients with severe eosinophil asthma [37–39]. In contrast,

Marcin Moniuszko and Andrzej Eljaszewicz contributed equally to this work as senior Authors.

✉ Marcin Moniuszko
Marcin.Moniuszko@umb.edu.pl

✉ Andrzej Eljaszewicz
Andrzej.Eljaszewicz@umb.edu.pl

¹ Department of Regenerative Medicine and Immune Regulation, Medical University of Białystok, ul. Waszyngtona 13, 15-269 Białystok, Poland

² Department of Allergology and Internal Medicine, Medical University of Białystok, ul. M. Skłodowskiej-Curie 24A, Białystok 15-276, Poland

concerns, iPSC-MSCs hold high therapeutic potential, which has been demonstrated in some preclinical studies [83]. It provides cautious hope for the future application of iPSC-MSCs in clinical settings following careful addressing safety concerns. To date, only two studies on iPSC-MSC-based treatment have been registered in the clinicaltrials.gov database. Mesenchymoangioblast-derived mesenchymal stem cells were tested in steroid-resistant Graft versus Host Disease (GvHD) [84], and acute distress respiratory syndrome in the course of COVID-19 [85].

In fact, according to available preclinical data, iPSC-MSCs reduce both Th2-driven and non-Th2-driven airway inflammation. Similarly to natural MSCs, administration of iPSC-MSCs decreased mucus production and immune cells' infiltration within lungs as well as interleukin (IL)-4, IL-5, and IL-13 levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). On the other hand, the limitation of non-Th2-driven inflammation was associated with a significant decrease in Th17 cell infiltration. Importantly, iPSC-MSCs have also been shown to reduce epithelium-derived alarmins, namely IL-33 and thymic stromal lymphopoietin (TSLP) [86–88].

iPSC-MSC represents a significant development of the research on the immunosuppressive activities of MSCs. Nevertheless, iPSC-MSC's application for the regulation of asthmatic inflammation requires further progress in understanding their long-term stability and function.

MSC-Mediated Modulation of Immune Responses

The MSCs may exert diverse immunomodulatory effects upon administration into different inflammatory conditions [89]. MSCs-mediated immune regulation seems to depend strictly on the local microenvironment, usually associated with the disease stage [90, 91]. The numerous reports have presented the MSCs-mediated immunoregulatory effects associated with: i) reduction of CD4+ and CD8+ T cell proliferation, [92] ii) inhibition of monocyte and CD34+ cells maturation towards proinflammatory macrophages and dendritic cells (DCs) [93], iii) recruitment Tregs and induction of effector T cell functional plasticity [94, 95], iv) inhibition of cytotoxicity and proliferation of natural killer (NK) cells [96, 97], and v) limitation of B cells maturation and antibody production [98, 99].

Despite an accumulating body of evidence showing the effectiveness of MSCs administration in preclinical and clinical settings, several studies reported failures in their application for immune response modulation in Graft-versus-Host Disease (GVHD) [100], Crohn Disease [101], and Systemic Lupus Erythematosus (SLE) [102]. However, it seems that the lack of desired immunosuppressive effects may be caused by inadequate MSCs "licensing" by the inflammatory mediators and/or untimely cell administration [89, 90]. More

specifically, a proper "licensing" (also known in the term "priming" or "preconditioning") is described as a process to prepare the cells to acquire specific properties in response to particular microenvironment components and conditions. To date, several reports demonstrated that hypoxia [103], TLRs agonists [104, 105], and proinflammatory mediators, including cytokines as crucial stimuli to enhance MSCs' immunomodulatory and regenerative properties [106–108]. In fact, the presence of cytokines characteristic for non-type two inflammation, interferon-gamma (IFN γ), IL-1 α , and IL-1 β [20, 94], induces MSC immunosuppressive functions. To date, it remains elusive whether type-2 related cytokines such as IL-4, IL-5, and IL-13 may directly induce regulatory properties of MSCs; however, their effectiveness in limiting Th2-driven inflammation is well established. Under resting conditions, MSCs have been shown to exert antiapoptotic effects and may act as functional "supporters" of various immune cells, such as T cells, B cells, and plasma cells [109]. Interestingly, the MSC polarization towards the proinflammatory phenotype has been observed in cells stimulated with Toll-like receptor (TLRs) agonists, such as a prototypic TLR2 ligand Pam3Cys [104, 110]. Thus, it seems that the immunosuppressive properties of MSCs are induced mainly by the proinflammatory cytokines rather than the constitutive function of these cells [109].

Notably, MSC-mediated interactions leading to the regulation of inflammatory responses are associated with both direct (cell-to-cell dependent) and indirect (soluble factor release dependent) mechanisms (Fig. 1) [111].

Cell Contact-Dependent Immune-Modulatory Mechanisms

The processes underlying cell-dependent mechanisms of MSCs-mediated immunosuppression involve a number of immunomodulatory membrane-bound proteins, including costimulatory receptors, membrane-bound cytokines, and small molecules [111–113]. This part will summarize the current understanding of the direct mutual interactions between MSCs and different immune cells.

Attenuation of T cell proliferation and induction of Tregs has been recognized as one of the hallmarks of MSCs immunomodulatory properties. This effect seems to be controlled by IFN γ [94]. In fact, IFN γ signaling in MSCs was shown to induce higher expression of checkpoint proteins, namely programmed cell death-ligand 1 (PD-L1, also known as B7-H1) and programmed cell death-ligand 2 (PD-L2, B7-DC) [95, 114, 115]. Both ligands interact with PD-1 on T and B cells and inhibit their T-cell receptor (TCR) and B cell receptor (BCR)-mediated activation, respectively [116].

In T cells, MSC dependent PD-1 signaling induces reduction of TCR-mediated IL-2 production and, in consequence,

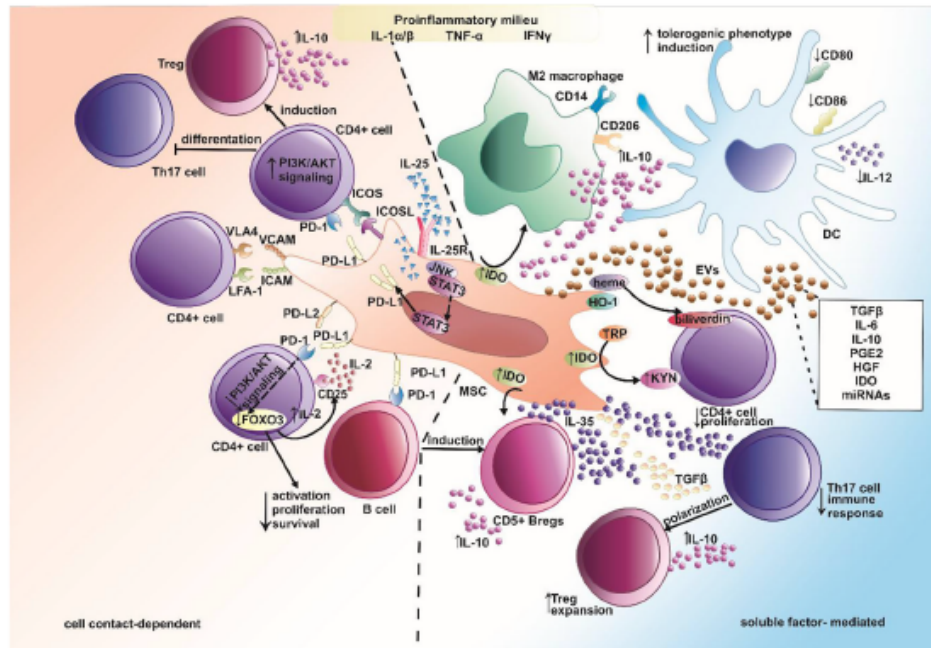


Fig. 1 The direct and indirect immunomodulatory mechanism of mesenchymal stem cells. Mesenchymal stem cells exert the immunosuppressive effects by direct (cell-to-cell dependent; marked on the orange background) and indirect (secretome-mediated; marked on the blue background) interactions with immune cells. Induction of immunosuppressive properties of MSCs requires proinflammatory signaling mediated by IL-1 α/β , TNF- α , IFN γ , among others. Breg- B regulatory cell; DC- dendritic cell; EVs- extracellular vesicles; FOXO3- forkhead box O3; HGF- hepatocyte growth factor; HO-1-heme oxygenase 1; ICAM- intracellular adhesion molecule 1; ICOS- inducible costimulator; ICOSL- inducible costimulator ligand; IDO- indoleamine 2,3-dioxygenase; IFN γ -

interferon gamma; IL-1 α , 1 β , 2, 6, 10, 12, 25, 35)- interleukin 1 α , 1 β , 2, 6, 10, 12, 25, 35; IL-25R- interleukin 25 receptor; JNK- c-Jun N-terminal kinase; KYN- kynurenine; LFA-1- lymphocyte function-associated antigen 1; MSC- mesenchymal stem cell; PD-1- programmed cell death receptor 1; PD-L(1/2)- programmed death-ligand 1/2; PGE2- prostaglandin E2; PI3K/ AKT- phosphoinositide 3-kinase/ protein kinase B; STAT3- signal transducer and activator of transcription 3; TGF β - transforming growth factor β ; TNF- α - tumor necrosis factor α ; Treg- T regulatory cell; TRP- tryptophan; VCAM1- vascular cell adhesion protein 1; VLA4- very late antigen 4, +activation/ induction; \uparrow increase; \downarrow decrease

decrease their proliferation and CD4 + CD25+ cell survival. In addition, PD-L1/PD-1 interaction was shown to downregulate Th17 cell activity and to reduce naïve CD4+ T cell differentiation towards Th1 and Th17 cells. The effects of Th17 cell-mediated suppression seems to be regulated by the IL-25/STAT3/PD-L1 axis [117]. In the in vivo settings, a decrease of proinflammatory (Th1/Th17) T cell infiltrate, after MSC administration, is usually associated with an increase in regulatory T cells' frequency. Recently, MSC mediated PD-1/PD-L1 and ICOS-ICOSL interactions were proposed to play a central role in the induction of conventional T cell plasticity and induction of regulatory like phenotype. MSC induced regulatory like T cells, possess stable immune-suppressive properties, and displayed DNA methylation profiles resembling natural Tregs [118, 119]. It seems that this functional conversion requires direct cell-to-cell interaction. Moreover, MSCs adhesion was shown to be crucial to induce immunosuppressive effects of MSC derived soluble factors, including lipid mediators such as prostaglandin E2 (PGE2), nitric oxide

(NO), cytokines (IL-2, IL-10, TSG-6), and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO); (for more details, please see Soluble Factor Mediated Immunomodulation section) [95, 113, 120–122]. VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) and ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1) seem to play an essential role in this process. Both receptors are constitutively expressed on MSCs, and their expression rises under IFN γ , tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-1 α , and IL-1 β , stimulation [123].

In contrast to T cells, to date, the mechanisms of contact-dependent MSC-mediated regulation of B cell responses remain elusive. In fact, the MSC-mediated effect on B cells, similarly to antigen-presenting cells (APC), namely monocytes and dendritic cells, has often been attributed to MSC-released mediators and will be discussed in the following section. However, some reports showed that MSC reduces plasma blasts formation and promotes immune suppressive and tolerogenic regulatory B cell (Breg) differentiation [98, 124, 125]. Interestingly, the latter effect seems to be controlled by

direct cellular interaction but after T cell-mediated proinflammatory cytokine conditioning of MSC [125, 126].

Soluble Factor-Mediated Immunomodulation

Besides the importance of contact-dependent effects, the vast majority of to date published reports describe MSC-mediated indirect immunosuppressive mechanisms. MSC-derived secretome consists of proteins, small molecules, and extracellular vesicles (EVs), released into extracellular space, acting as orchestrator of immune responses. Here, we summarize current advances in the understanding of the mechanisms of paracrine-mediated immune-modulation [127].

Similarly to previously described cell-dependent mechanisms, MSC licensing by inflammatory cytokines is required to activate their immune-modulatory factors' secretion. In the presence of IFN γ , MSCs release high amounts of IDO, which metabolizes the degradation of tryptophan to toxic catabolites accumulation, namely kynurenine, L-tryptophan, kynurenic acid, quinolinic acid, and anthranilic acid [122]. However, only the kynurenine impairs the effector function and proliferation of T cells [122]. Notably, the IDO-mediated effect on tryptophan depletion has been identified only locally [89, 127]. Therefore, it seems that cell-to-cell adhesion is required for effect. In addition, IDO activity has been shown to induce monocytes' differentiation towards IL-10, producing immunosuppressive CD14 + CD206+ macrophages (alternatively activated M2 cells), and thus limiting T cell activation and proliferation. Moreover, IDO dependent pathways play a role in CD5+ regulatory B cell (Breg) induction [128]. Similarly to IDO, NO has been proposed as an essential factor in regulating T cell responses that may require direct interaction of MSC and T cells [129]. Furthermore, MSCs involve oxidative stress pathways through inducible cytoprotective enzyme heme oxygenase 1 (HO-1) that catalyzes the heme to biliverdin, which in turn suppresses T cell proliferation [130].

Similarly to small molecules, MSC-derived anti-inflammatory cytokines, namely IL-10, IL-35, and TGF β , play a central role in indirect immune regulatory mechanisms. The anti-inflammatory properties of IL-10 were recognized as a central mechanism of MSC-mediated regulation of innate and adaptive immune compartments. Its function is associated with: downregulation of Th1 and Th17 derived cytokines [94], regulation of HLA-DR, CD80, and CD86 expression on APC and thus induction of their tolerogenic phenotype [131, 132], blocking of NF- κ B signaling [133], regulation of IL-1 α , IL-1 β [134], IL-12p40 [135], IFN γ [136], and TNF- α production [134], among others. Notably, by induction of regulatory T cells and alternatively activated macrophages, MSCs indirectly enhance IL-10 release [93, 137, 138]. In some contrast to IL-10, IL-35 represents a relatively new described cytokine belonging to the IL-12 family [139]; thus, its function remains

not fully elucidated. Immune regulatory properties of IL-35 are associated with the selective expansion of Treg and a decrease of Th17 immune response [140]. Moreover, MSC-derived IL-35 promotes the conversion of B cells to IL-10 producing Bregs [141]. However, further studies are needed to better understand the importance of MSC-derived IL-35 in immune regulation, healing, and regeneration. On the other hand, TGF β may act as both a potent regulator or an activator of innate and adaptive immune responses [142]. Its function depends on the composition of local activating factors (recently reviewed elsewhere [143]). However, it seems that MSC-derived TGF β contributes to the polarization of activated T cells towards Tregs and promotes their expansion. In addition, recently, TGF β induced plasticity of Th17 cells towards regulatory phenotype was reported [144]; however, the mechanism remains elusive. In macrophages, TGF β was shown to regulate NF- κ B signaling and thus control their inflammatory response. Moreover, it polarizes monocytes towards M2 alternatively activated cells [145]. On the other hand, however, TGF β signaling has been found to play a role in lung fibrosis and promotion of Th17 cells in which other MSC-derived factors may further induce functional plasticity [142, 146]. However, complex interplay between different protein and non-protein components of MSC-derived secretome and their effects on immune function needs more attention in the future.

In the past two decades, an additional cellular communication mechanism that involves the transfer of extracellular vesicles (EVs) has been proposed as a soluble factor-dependent mechanism [3, 147, 148]. EVs are classified according to their cellular origins into exosomes (endocytic bodies in the size of 30–150 nm), microvesicles (vehicles derived from the budding of the cell membrane in the size of 100–1000 nm), and apoptotic bodies (500–5000 nm) [148–150]. Recently, it became clear that EVs represent an important component of MSC-derived secretome. Both exosomes and microvesicles show overlapping characteristics and may shuttle functional proteins, lipids, and nucleic acids (including mRNAs, miRNAs, and lncRNAs) with immune-modulatory properties. In fact, over 900 different proteins have been currently recognized in MSC-derived EVs according to the exosome database, available at: <http://www.exocarta.org>. EVs are characterized by the presence of surface CD9, CD29, CD44, CD63, CD73, CD81, CD105, and CD107. Immune regulatory properties are linked especially to growth factors and cytokine (TGF β , IL-6, IL-10, and HGF) [96, 132, 151–154], enzymes (IDO) [155], lipid mediators (PGE-2) [156, 157], and miRNAs (miR-155, miR-146, and miR-594) [158]. It seems, however, that the content depends on the activation and the source of MSCs. MSC-derived EVs were shown to i) decrease IL-1 β and TNF- α expression in glial cells [159], ii) regulate T cell responses, and increase Treg proliferation [160], iii) regulate DC maturation [161, 162], and iv) suppress mast cell activation [163]. Interestingly, it appeared that the beneficial

effects of MSC-derived EVs are comparable to entire MSCs. Therefore, they are increasingly recognized as a potential therapeutic factor for inflammatory and degenerative diseases. However, to date, the effects of MSC-derived EVs in the regulation of asthmatic inflammation remain elusive.

Mechanisms of MSC Mediated Regulation of Asthmatic Lung Inflammation

Asthmatic airway inflammation should be considered a complex network of interactions between different lung resident cells, immune cells, growth factors, enzymes, cytokines, chemokines, metabolites, and miRNAs [164]. Unfortunately, our understanding of the effects of MSC on this network is significantly restricted due to limitations of used models, namely xenotransplantation models of human MSC into mice or usage of mice cells only (Table 1). However, in this section, we summarize the current understanding of MSC effects on each of the lung's crucial inflammatory cascade components (Fig. 2).

To date, MSCs-mediated effects on T cell function are the best characterized and are associated with the regulation of their proliferation and functional plasticity [165, 166]. T cell proliferation leads to the formation of high numbers of effector cells [167]. Activated MSCs regulate this process by the production of nitric oxide (NO) and PGE2 [168, 169]. NO production in MSC is controlled by inducible nitric oxide synthase (iNOS) [170]. This pathway increases NO levels, which induces S-nitrosylation of transcription factors, metabolic enzymes, and cytoskeletal proteins [171]. In some contrast, PGE2 promotes T cell anergy by the regulation of IL-2 production and IL-2R (CD25) expression on activated cells [117, 172]. In addition, PGE2 has been demonstrated to suppress Th1 differentiation and enhance the induction and differentiation of adaptive regulatory T cells in the lungs [94].

Although T cells acquire their effector function towards antigen presentation by antigen-presenting cells (APC) upon TCR and costimulatory molecule engagement, they may retain functional plasticity and acquire additional cytokine-producing capacities upon re-stimulation [173]. Interestingly, MSC may directly induce functional plasticity by the epigenetic reprogramming of Th17 cells. In fact, the interaction between IFN γ and TNF- α activated MSCs and Th17 cells via CD56 – CCR6 (CD196) receptors induces IL-10 production and histone H3K4me3 trimethylation in the FOXP3 locus promoter with subsequent suppression of RAR-related orphan receptor C (RORC) [174]. Consequently, Th17 cells lose their immune-activatory properties and acquire suppressive (regulatory) functions. Furthermore, MSCs have been shown to regulate the expression of Th2 cytokines, namely IL-4, IL-5, and IL-13 [36, 175–183]. However, it needs to be addressed whether

observed regulation may represent a consequence of T cell plasticity or is a consequence of Th2 cell anergy and in consequence apoptosis. Notably, a manifestation of disease symptoms considered extensively as hallmarks of asthma is directly or indirectly related to the overproduction of IL-4, IL-5, and IL-13 [184, 185]. More specifically, IL-4 synergistically with IL-13 induces the antibody class switching towards immunoglobulin E (IgE), produced by B cells [184], whereas IL-5 plays a key role in the survival, differentiation, degranulation, and recruitment of eosinophils to the site of inflammation [184, 186]. In mice that lack IL-4, IL-5, IL-13 reduction of asthma symptoms was observed in the Ova-A lum experimental model. Thus, administration of MSC may block the initial steps of allergic sensitization cascade through regulation of Th2-related cytokines [165, 177, 178, 187–189]. Nevertheless, it became clear that activated MSC may enhance regulatory T cell activity and induce the production of anti-inflammatory cytokines, namely IL-10 and TGF β , in both direct and indirect mechanisms. It seems that soluble factor-mediated mechanisms are sufficient to induce regulatory effector functions of Treg, while direct cell-to-cell interaction is needed for their expansion [36, 165, 178, 190, 191]. Nonetheless, the mechanistic of MSC-Treg interactions remain poorly understood and are likely to be complex and dependent on the local lower airway microenvironment.

Dendritic cells (DCs) are referred to as a professional antigen-presenting cell (APC) linking innate and adaptive immune responses. Therefore, they are recognized as central players in the inflammatory cascade [192, 193]. It seems that MSC may directly regulate DC maturation and differentiation from monocytes and CD34+ progenitors through PGE2 dependent mechanism [194]. Notably, immature or semi-mature DCs possess tolerogenic properties and may regulate T cells' proinflammatory responses and induce Treg maturation. In contrast to immature DCs, mature cells from asthmatic patients present high expression of costimulatory molecules, namely CD80 and CD86, and possess high T cell stimulatory properties [132, 195]. In fact, they are involved in the polarization of T cell responses towards Th1/Th17 or Th2 cells and thus may support both eosinophilic and non-eosinophilic (neutrophilic) lung inflammation [164, 180, 181, 193]. Importantly, however, MSCs were shown to decrease the above-described properties by regulation of DC expression of costimulatory molecules and proinflammatory cytokine secretion. In addition, MSC decreases the release of CC chemokine ligand (CCL)17 and CCL22 chemokines by dendritic cells and, thus, regulate T cell responses within the lung [196].

Similarly to DCs, macrophages possess antigen-presenting capacities, and due to their pleiotropic biological activities, they may orchestrate both adaptive and innate immune responses. Macrophages can be polarized towards two distinct phenotypes, namely M1 (classically activated) and M2 (alternatively activated) cells [197–200]. M1 macrophages are

Table 1 (continued)

Source and number of MSC	Route of MSC administration	Type of experimental asthma model	Mice strain	Histological outcome and respiratory mechanics	Immunomodulatory outcome or proposed mechanism	Reference
Mice ADMSCs (1×10^6 cells)	Intravenously	Intraperitoneal injection with 0.1% OVA (in PBS); challenge with aerosolized 2.5% OVA (in PBS)	BALB/c	In the chronic model: ↓ airway lymphocytes, neutrophils, eosinophils count ↓ mucus secretion	↑ total IgE in serum ↓ IL-13 in BALF ↓ CD11b+DCs in lungs ↓ MHCII CD86+ DCs in lungs ↓ DCs in mLNs JIL-25, IL-1 α in the lung JIL-4, IL-17F in BALF JIL-10, IFN γ in BALF ↑ CD4+CD25+ Foxp3 cells in spleen	[180]
Human UCMSCs (0.3×10^6 , 0.6×10^6 cells)	Intravenously	Intranasal sensitization with 75 μ g OVA and 10 μ g Poly(I:C); intranasal challenge with 50 μ g OVA and 10 μ g Poly(I:C)	BALB/c	↑ airway inflammation ↓ total number of cells and neutrophils in BALF	JIL-5 and CXCL15 in BALF ↓ IL-10, IFN γ in BALF JIL-5, IL-17, IFN γ in mLNs ↓ IL-10 in mLNs	[181]
BMMSCs, ADMSCs, LMSCs (0.1×10^6 cells)	Intratracheally	Intraperitoneal injection with OVA 0.1 μ g/1 μ l (in saline); intratracheal administration with 1 μ g/1 μ l of OVA (in saline)	C57BL/6	Lung mechanics, whereas greater extent to BMMSCs ↓ inflammatory cell infiltration in lung tissue ↓ the alveolar collapse in the lung parenchyma (only after BMMSCs administration) ↓ collagen fiber content (only after BMMSCs)	↓ IL-4 and IL-13 in lung tissue homogenates, whereas greater after BMMSC and ADMSC compared to LMSCs ↑ IL-10 in lung tissue homogenates and whereas greater after BMMSC and ADMSC compared to LMSCs ↑ TGF β in lung tissue homogenates, comparable for all MSC types ↑ VEGF in lung tissue homogenates, whereas greater after BMMSC	[182]
Human BMMSCs (1×10^6 cells)	Intravenously	Intraperitoneal injection with 10 μ g OVA in 1.5 ml of Al(OH) ₃ (100 μ g total volume); an intranasal challenge with 1% weight/volume OVA in PBS	BALB/c	↓ total number of cells in BALF ↓ epithelial cell thickening ↑ mucus production, goblet cells hyperplasia ↓ collagen cell deposition	JVEGF in lung tissue homogenates, whereas greater after BMMSC ↓ systemic IgE JIFN γ , IL-5, IL-13 in BALF ↓ TNF- α , IL-6 in BALF ↑ MIP-1 α and KC in BALF ↓ iNOS in the lungs	[183]
Human ADMSCs, UCMSCs, BMMSCs (1×10^6 cells)	Intravenously	Intraperitoneal injection with 50 μ g OVA with 2 mg aluminum hydroxide gel; intranasal administration with 50 μ g OVA	Balb/c	ADMSC-, UCMSC- and BMMSC-mediated effect: ↓ airway eosinophilia ↓ inflammatory cells in airway tissue ↓ eosinophil count in BALF	ADMSC-, UCMSC- and BMMSC-mediated effect: JIL-5 and IL-13 by mLNs T cells ↓ IFN γ by mLNs T cells ↑ proportion and absolute number of alveolar macrophages ADMSC mediated effect: JIL-4 by bronchial and mLNs T cells JIL-5 in BALF and lungs ↓ M1/M2 switching in lungs ↓ TGF β in lungs macrophages ↓ IL-10 in lungs macrophages JIL-4, IL-5, IL-13 in BALF ↑ IL-10 in BALF ↑ CCR2+ monocytes recruitment to the lung ↓ CD4+ and CD8+ T cells in the lung tissue ↓ CD11b+Ly6G+ neutrophils in the lung tissue ↓ B cells in lung tissue ↓ NK cells in lung tissue ↑ IL-10 producing monocytes/macrophages depend on IFN γ primed CCL2/CCR2 pathway in lung tissue	[187]
Mice ADMSCs (0.2×10^6 cells)	Intravenously	Intraperitoneal injection with 20 μ g OVA with 1 mg of alum as an adjuvant; nebulization OVA (1% in saline)	C57BL/6 (WT; IFN- γ ^{-/-} ; IFN- γ R ^{-/-} ; CCL2 ^{-/-})	↑ airway eosinophilia ↓ eosinophil count in BALF ↓ goblet cell metaplasia	JIL-4, IL-5, IL-13 in BALF ↑ CCR2+ monocytes recruitment to the lung ↓ CD4+ and CD8+ T cells in the lung tissue ↓ CD11b+Ly6G+ neutrophils in the lung tissue ↓ B cells in lung tissue ↓ NK cells in lung tissue ↑ IL-10 producing monocytes/macrophages depend on IFN γ primed CCL2/CCR2 pathway in lung tissue	[188]
Mice BMMSCs (2×10^6 cells)	Intravenously	Intraperitoneal injection with 100 mg of OVA in 9% aluminum hydroxide hydrate; intratracheal	C57BL/6	↑ airway eosinophilia ↓ peribronchovascular inflammation and eosinophilia ↓ airway hyperplasia	↑ CXCR4/SDF-1 axis dependent migration of MSC to lungs ↓ mast cell mediator (β -hexosaminidase) and mast cell degranulation JIL-4, IL-5, IL-9 in BALF	[189]

Table 1 (continued)

Source and number of MSC	Route of MSC administration	Type of experimental asthma model	Mice strain	Histological outcome and respiratory mechanics	Immunomodulatory outcome or proposed mechanism	Reference
Mice BMMSCs and ADMSCs (0.1 × 10 ⁶ cells)	Intratracheally	challenged with 100 mg OVA (in PBS) Intranasal induction with 1 µg/µl of HDM extract in PBS	C57BL/6	BMMSC-mediated effect: ↓ lung elastance (only in combination with methacholine) ↓ eosinophils, macrophages, and neutrophils count in BALF ADMSC-mediated effect: ∅ lung elastance and airway resistance ↓ macrophages and neutrophils count in BALF ADMSC- and BMMSC-mediated effect: ∅ presence of lung inflammatory pockets and mucus-filled cells ↓ AIR ↓ eosinophilia in BALF	↑ IFN-γ and IFN-γ/IL-4 (mRNA) ratio; shift from Th2 to Th1 response BMMSC-mediated effect: ↑ IL-10 in lung homogenate ∅ CD4+ IL-10 producing cells ↓ IL-18, IL-6 in alveolar macrophages ↓ B cells in mLNs ↓ CD4+ cells in mLNs ADMSC- and BMMSC-mediated effect: ∅ CCL11, CCL24, IL-4, IL-5, TGFβ in lung homogenate ∅ CD4+ cells in BALF ↓ number of CD4+CD25+Foxp3+ cells in BALF ∅ CD4+CD25+Foxp3+ cells in mLNs ∅ macrophage recruitment ↑ polarization of CD163+ M1 macrophages toward CD163+ M2 macrophages through TGFβ dependent signaling	[191]
Human BMMSCs (1 × 10 ⁶ cells)	Intravenously	Intraperitoneal injection with 50 µg OVA with 2 mg aluminum hydroxide gel; an intranasal challenge with 50 µg OVA	NOD/SCID	↓ immune cells infiltration in the lungs ↓ goblet cells number ↓ epithelium the smooth muscle layer, basement membrane thickness		[204]
Mice BMMSCs (0.25 × 10 ⁶ cells)	Intravenously	Intraperitoneal sensitization with 10 µg/0.1 ml OVA in alum adjuvant; a challenge with 1% aerosolized OVA (in PBS) via airways	BALB/c	↓ eosinophils, eosinophil, monocytes count in BALF ↓ airway inflammation, goblet cells hyperplasia, subepithelial fibrosis	↑ CD4+CD25+Foxp3 cells frequency in T lymphocytes in lungs	[212]
Mice BMMSC (0.5 × 10 ⁶ cells)	Intratracheally	Intraperitoneal injection with 100 µg OVA in 1.3 mg aluminum hydroxide (in 200 µl); nebulization with 2.5% OVA (in PBS)	Balb/c		↑ IL-12 in serum and BALF ↓ IL-4 in serum and BALF ∅ IL-10, IFN-γ, IL-13 ↑ ratio CD4+CD25+ cells/lymphocytes in pulmonary lymph nodes	[211]

ADMSCs- adipose tissue-derived mesenchymal stem cells; AHR- airway hyperresponsiveness; BALF- bronchoalveolar lavage fluid; BMMSCs- bone marrow-derived mesenchymal stem cells; CD4, 8, 11b, 25, 163)- cluster of differentiation 4, 8, 11b, 25, 163; CCL2, 11, 24)- chemokine (CC motif) ligand 2, 11, 24; CCR2- CC chemokine receptor type 2; COX2- cyclooxygenase 2; CXCL15- chemokine (CXC motif) ligand 15; CXCR4- CXC chemokine receptor type 4; DCs- dendritic cells; EVs- extracellular vesicles; FGFB- basic fibroblast growth factor; Foxp3- forkhead box p3; HDM- house dust mite; IDO- indoleamine 2,3-dioxygenase; IFN-γ- interferon gamma; IgE, G1, G2)- immunoglobulin E, G1, G2; IL-1a, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 17, 25)-interleukin 1a, 4, 5, 6, 9, 10, 12, 13, 17, 25; ILCS- innate lymphoid cells; iNOS- inducible nitric oxide synthase; Ly6G- lymphocyte antigen 6 complex locus G6D; KC- keratinocyte derived chemokine; LMSCs- lung derived mesenchymal stem cells; MCA- MSCs- mesenchymal stem cell-derived mesenchymal stem cells; MHCII- major histocompatibility complex class II; PBS- phosphate buffered saline; MIP-1 α- macrophage inflammatory protein 1 α; mLNs- mediastinal lymph nodes; MMP9- matrix metalloproteinase 9; OVA- Ovalbumin; SDF-1- stromal-derived factor 1; TGFβ- transforming growth factor-beta; TNF-α- tumor necrosis factor-alpha; UCMSCs- umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells; VEGF- vascular endothelial growth factor; WT- wild type, ∅ no effect observed; ↑an increase / improvement; ↓a decrease/ limitation

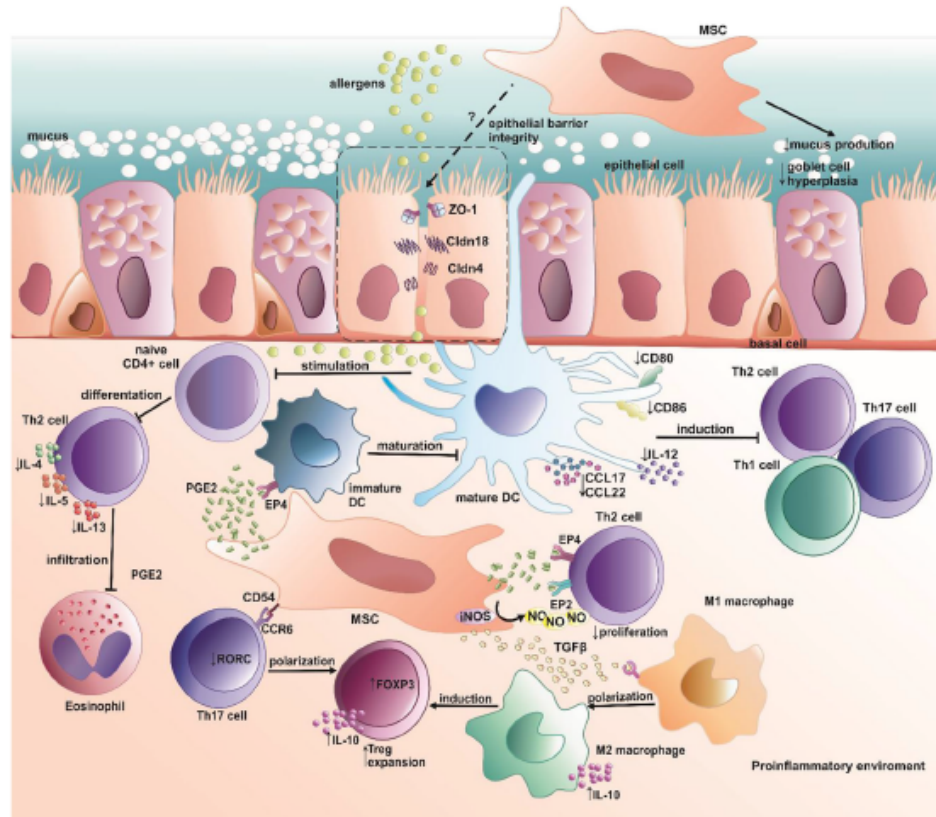


Fig. 2 Mesenchymal stem cells-mediated immunomodulatory effects in the airways. Summary of immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in asthmatic lung inflammation. The set of proinflammatory cytokines secreted in the course of asthma causes the priming of mesenchymal stem cells and induces their immunosuppressive activities. Importantly, induction of regulatory T cells, alternatively activated macrophages (M2), and tolerogenic dendritic cells (DCs) represent to date best-described mechanisms regulating Th2-driven and non-Th2-driven immune responses. CCL(17/22)- chemokine C-C motif ligand 17/22;

CCR6- C-C chemokine receptor 6; Cldn(4/18)- claudin 4/18; MSC- mesenchymal stem cell; ZO-1- zonula occludens 1; DC- dendritic cells; EP(2/4)- prostaglandin E2 receptor 2/4; FOXP3- forkhead box p3; IL- (4, 5, 10, 12, 13, 35)- interleukin 4, 5, 10, 12, 13, 35; iNOS- inducible nitric oxide synthase; NO- nitric oxide; PGE2- prostaglandin E2; RORC- RAR-related orphan receptor gamma; TGFβ- transforming growth factor β; ←- activation/ induction; ⊥- inhibition; ←- unknown effect; ↑increase; ↓decrease

recognized as immune stimulatory cells producing high amounts of proinflammatory cytokines (including TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12, and IL-23), chemokines (such as CCL5, CCL8, CXCL2, and CXCL4), polarizing T cell responses towards Th1 and Th17, and possess high antigen presentation capacity. In contrast, M2 macrophages possess immune regulatory/repairatory properties with high secretion of anti-inflammatory IL-10, IL-35, TGF β , IL-1 receptor antagonist (IL-1RA), CCL16, CCL18, and CCL22, the ability for induction of regulatory T cells, and lack of cytotoxic activity [187, 201–203]. However, due to their capability to support Th2 response, their role in allergic lung inflammation remains not fully elucidated. Interestingly, MSCs were shown to support macrophages' alternative activation in the IL-10 and/or

TGF β related mechanism [98, 204]. In fact, an accumulating body of evidence indicates the central role of alveolar macrophages in the MSCs-mediated immunosuppression in the asthmatic lung. It seems that the MSC-induced M2-derived immunosuppression supports induction of regulatory T cells within the lungs [204]. However, the mechanisms of MSC-macrophage mutual interactions need to be elucidated in the future.

Airway epithelial cells play a central role in innate immune function as the first line of defense against biological, physical, and chemical stressors. Moreover, activated epithelial cells play a central role in inflammatory cascade by releasing inflammatory mediators, namely cytokines and chemokines [193, 205, 206]. The function of epithelial barrier depends

directly on the expression of proteins building tight connections between epithelial cells referred to as tight junction (TJ) proteins [186]. Disruption of their function is currently recognized as a hallmark of asthma [184, 185, 207]. Moreover, differentially regulated expression of tight junction related genes may be observed in distinct asthma phenotypes [186]. More specifically, reduced zonula occludens-1 (ZO-1) and Claudin 18 expression are typical for all asthma phenotypes, while the upregulation of Claudin 4 and Claudin 7 seems to be specific only to neutrophilic airway inflammation [186, 208]. By some contrast, Claudin 1, Claudin 5, and Claudin 7 expression were downregulated only in the eosinophilic phenotype [186]. Thus, the personalized targeting of particular tight junction proteins may be a useful therapeutic option for individual asthma phenotypes. In fact, impairment of epithelial integrity, observed in asthma, results in barrier leaking, leading to the intensified inflammatory response [205, 206]. Unfortunately, to date, the influence of the MSCs on the epithelial barrier function remains elusive. Notably, disrupted epithelial barrier integrity and uncontrolled lung inflammation may partially contribute to the development of the combination of irreversible structural changes within the lung tissue referred to as airway remodeling [209]. Mucus overproduction, smooth muscle hyperplasia, and increased collagen deposition, resulting in airflow obstruction contribute to the clinical manifestation of a disease. Although some of the concepts explain airway remodeling development to some degree, to date, available therapies do not allow to alleviate its progress [210]. However, several studies reported that MSC administration attenuates airway remodeling by limiting goblet cell hyperplasia, epithelial thickness, subepithelial smooth muscle hyperplasia, and inhibit collagen deposition [35, 211–214]. Notably, the mechanism underlying the mentioned beneficial effects of MSCs remains elusive. Increased deposition of collagen fibers (collagen I, III, V, XI) to extracellular matrix seems to be strongly related to the secretion of profibrotic factor from eosinophils, such as TGF β [215, 216]. In addition, TGF β promotes the release of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), which subsequently contributes to extend collagen deposition [217]. Nevertheless, the loss or augmentation of MMPs activity, also through inadequate control by their tissue inhibitors (TIMPs) results in fibrosis development. Thus, the maintaining or restoring of a balance between MMPs and TIMPs activity seems to prevent remodeling development [218]. Notably, both intranasal and intravenous administration of MSCs causes the increased activity of MMP-9 suggesting activation of compensatory processes [88]. Interestingly, TGF β may act as a regulator of MSCs mediated immunosuppression; however, MSCs decrease the level of TGF β within the lung tissue and thus may limit lung remodeling [204]. Therefore, implementation of mesenchymal stem cells may hold great promise for preventing pathological tissue reconstructions observed in inflamed lung remodeling.

Unfortunately, the mechanism underlying the mentioned beneficial effects of MSCs remains elusive and need further research.

Conclusions

The accumulating body of evidence confirms the beneficial effects of MSCs in different preclinical asthma models. The vast majority of published studies utilized the xenotransplantation of human MSC into mice. Notably, the model possesses critical weaknesses resulting from some of the MSC-derived mediators' restricted species function. On the other hand, however, mice MSCs may not fully cover the human MSC function. Indeed, these issues represent a significant obstacle to understanding the mechanisms by which MSCs regulate asthmatic lung inflammation and postpone their use in clinical practice. However, according to the clinical trials database (<http://clinicaltrials.gov>) first clinical trial was performed to assess the safety, tolerability, and efficacy of allogeneic human mesenchymal stem cells infusion in a total of 6 patients with mild asthma [219]. The study was terminated as the first cohort was completed. Unfortunately, to date, the results are not yet available.

In summary, we do not claim that stem cell-based therapies should or will replace currently used effective first-line treatment in asthma. However, stem cells can become an attractive and relatively safe option for helping those patients who failed to satisfactorily respond to conventional treatment.

Acknowledgements Publication was written during doctoral studies under the project № POWR.03.02.00-00-1050/16 co-funded from European Union funds, PO WER 2014-2020. Andrzej Eljaszewicz and Marcin Moniuszko are supported by grant from the National Centre for Research and Development (POLTUR3/MT-REMOD/2/2019).

Availability of Data and Material Not applicable.

Author Contributions MT and AE wrote the manuscript. MT designed and prepared figs. AE and MM revised manuscript.

Declarations

Ethical Approval The content of the manuscript is original and it has not been published or accepted for publication, either in whole or in part, in any form. No part of the manuscript is currently under consideration for publication elsewhere.

Consent to Participate Not applicable.

Consent for Publication Not applicable.

Conflict of Interest The authors declare that they have no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Trounson, A., & McDonald, C. (2015). Stem cell therapies in clinical trials: Progress and challenges. *Cell Stem Cell*, 17(1), 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.06.007>.
- Rezania, A., Bruin, J. E., Arora, P., Rubin, A., Batushansky, I., Asadi, A., O'Dwyer, S., Quiskamp, N., Mojibian, M., Albrecht, T., Yang, Y. H. C., Johnson, J. D., & Kieffer, T. J. (2014). Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 32(11), 1121–1133. <https://doi.org/10.1038/nbt.3033>.
- Ratajczak, M. Z., Kucia, M., Jadczyk, T., Greco, N. J., Wojakowski, W., Tenders, M., & Ratajczak, J. (2012). Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: Can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies? *Leukemia*, 26(6), 1166–1173. <https://doi.org/10.1038/leu.2011.389>.
- Pamar, M., Grealish, S., & Henchcliffe, C. (2020). The future of stem cell therapies for Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(2), 103–115. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0257-7>.
- Madl, C. M., Heilshorn, S. C., & Blau, H. M. (2018). Bioengineering strategies to accelerate stem cell therapeutics. *Nature*, 557(7705), 335–342. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0089-z>.
- Guha, P., Morgan, J. W., Mostoslavsky, G., Rodrigues, N. P., & Boyd, A. S. (2013). Lack of immune response to differentiated cells derived from syngeneic induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 12(4), 407–412. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.01.006>.
- Itakura, G., Kawabata, S., Ando, M., Nishiyama, Y., Sugai, K., Ozaki, M., Iida, T., Ookubo, T., Kojima, K., Kashiwagi, R., Yasutake, K., Nakauchi, H., Miyoshi, H., Nagoshi, N., Kohyama, J., Iwanami, A., Matsumoto, M., Nakamura, M., & Okano, H. (2017). Fail-safe system against potential tumorigenicity after transplantation of iPSC derivatives. *Stem Cell Reports*, 8(3), 673–684. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.02.003>.
- Zhao, T., Zhang, Z. N., Rong, Z., & Xu, Y. (2011). Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*, 474(7350), 212–215. <https://doi.org/10.1038/nature10135>.
- Araki, R., Uda, M., Hoki, Y., Sunayama, M., Nakamura, M., Ando, S., Sugiura, M., Ideno, H., Shimada, A., Nifuji, A., & Abe, M. (2013). Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature*, 494(7435), 100–104. <https://doi.org/10.1038/nature11807>.
- Huang, X. P., Sun, Z., Miyagi, Y., McDonald Kinkaid, H., Zhang, L., Weisel, R. D., & Li, R. K. (2010). Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair. *Circulation*, 122(23), 2419–2429. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.955971>.
- Rama, P., Matuska, S., Paganoni, G., Spinelli, A., De Luca, M., & Pellegrini, G. (2010). Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *The New England Journal of Medicine*, 363(2), 147–155. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0905955>.
- Lee, J. S., Hong, J. M., Moon, G. J., Lee, P. H., Ahn, Y. H., Bang, O. Y., & STARTING collaborators. (2010). A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells*, 28(6), 1099–1106. <https://doi.org/10.1002/stem.430>.
- Martin, R. M., Fowler, J. L., Cromer, M. K., Lesch, B. J., Ponce, E., Uchida, N., Nishimura, T., Porteus, M. H., & Loh, K. M. (2020). Improving the safety of human pluripotent stem cell therapies using genome-edited orthogonal safeguards. *Nature Communications*, 11(1), 2713. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16455-7>.
- Approved Cellular and Gene Therapy Products (2020). <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products>. Accessed December 9, 2020.
- First stem-cell therapy recommended for approval in EU (2014). <https://www.ema.europa.eu/en/news/first-stem-cell-therapy-recommended-approval-eu>. Accessed December 9, 2020.
- Martin, I., Galipeau, J., Kessler, C., Le Blanc, K., & Dazzi, F. (2019). Challenges for mesenchymal stromal cell therapies. *Science Translational Medicine*, 11(480), eaat2189. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat2189>.
- De Luca, M., Aiuti, A., Cossu, G., Pamar, M., Pellegrini, G., & Robey, P. G. (2019). Advances in stem cell research and therapeutic development. *Nature Cell Biology*, 21(7), 801–811. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0344-z>.
- Kay, A. G., Long, G., Tyler, G., Stefan, A., Broadfoot, S. J., Piccinini, A. M., Middleton, J., & Kehoe, O. (2017). Mesenchymal stem cell-conditioned medium reduces disease severity and immune responses in inflammatory arthritis. *Scientific Reports*, 7(1), 18019. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18144-w>.
- Murphy, K. C., Whitehead, J., Falahee, P. C., Zhou, D., Simon, S. I., & Leach, J. K. (2017). Multifactorial experimental design to optimize the anti-inflammatory and Proangiogenic potential of Mesenchymal stem cell spheroids. *Stem Cells*, 35(6), 1493–1504. <https://doi.org/10.1002/stem.2606>.
- Redondo-Castro, E., Cunningham, C., Miller, J., Martuscelli, L., Aoulad-Ali, S., Rothwell, N. J., Kilty, C. M., Allan, S. M., & Pinteaux, E. (2017). Interleukin-1 primes human mesenchymal stem cells towards an anti-inflammatory and pro-trophic phenotype in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0531-4>.
- Luger, D., Lipinski, M. J., Westman, P. C., Glover, D. K., Dimastromatteo, J., Frias, J. C., Albelda, M. T., Sikora, S., Kharazi, A., Vertelov, G., Waksman, R., & Epstein, S. E. (2017). Intravenously delivered Mesenchymal stem cells: Systemic anti-inflammatory effects improve left ventricular dysfunction in acute myocardial infarction and ischemic cardiomyopathy. *Circulation Research*, 120(10), 1598–1613. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310599>.
- Park, S. R., Kim, J. W., Jun, H. S., Roh, J. Y., Lee, H. Y., & Hong, I. S. (2018). Stem cell Secretome and its effect on Cellular mechanisms relevant to wound healing. *Molecular Therapy*, 26(2), 606–617. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.09.023>.
- Tachibana, A., Santoso, M. R., Mahmoudi, M., Shukla, P., Wang, L., Bennett, M., Goldstone, A. B., Wang, M., Fukushi, M., Ebert, A. D., Woo, Y. J., Rulifson, E., & Yang, P. C. (2017). Paracrine

- effects of the pluripotent stem cell-derived cardiac Myocytes salvage the injured myocardium. *Circulation Research*, 121(6), e22–e36. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310803>.
24. Li, X., Xie, X., Lian, W., Shi, R., Han, S., Zhang, H., Lu, L., & Li, M. (2018). Exosomes from adipose-derived stem cells overexpressing Nrf2 accelerate cutaneous wound healing by promoting vascularization in a diabetic foot ulcer rat model. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(4), 29. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0058-5>.
 25. de Mendonça, L., Felix, N. S., Blanco, N. G., Da Silva, J. S., Ferreira, T. P., Abreu, S. C., et al. (2017). Mesenchymal stromal cell therapy reduces lung inflammation and vascular remodeling and improves hemodynamics in experimental pulmonary arterial hypertension. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 220. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0669-0>.
 26. Uemura, R., Xu, M., Ahmad, N., & Ashraf, M. (2006). Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circulation Research*, 98(11), 1414–1421. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000225952.61196.39>.
 27. Lan, Y. W., Choo, K. B., Chen, C. M., Hung, T. H., Chen, Y. B., Hsieh, C. H., Kuo, H. P., & Chong, K. Y. (2015). Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Stem Cell Research & Therapy*, 6, 97. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0081-6>.
 28. Horton, J. A., Hudak, K. E., Chung, E. J., White, A. O., Scroggins, B. T., Burkeen, J. F., & Citrin, D. E. (2013). Mesenchymal stem cells inhibit cutaneous radiation-induced fibrosis by suppressing chronic inflammation. *Stem Cells*, 31(10), 2231–2241. <https://doi.org/10.1002/stem.1483>.
 29. Wilson, J. G., Liu, K. D., Zhuo, H., Caballero, L., McMillan, M., Fang, X., Cosgrove, K., Vojnik, R., Calfee, C. S., Lee, J. W., Rogers, A. J., Levitt, J., Wiener-Kronish, J., Bajwa, E. K., Leavitt, A., McKenna, D., Thompson, B. T., & Matthay, M. A. (2015). Mesenchymal stem (stromal) cells for treatment of ARDS: A phase I clinical trial. *The Lancet Respiratory Medicine*, 3(1), 24–32. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70291-7](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70291-7).
 30. Glassberg, M. K., Minkiewicz, J., Toonkel, R. L., Simonet, E. S., Rubio, G. A., DiFede, D., Shafazand, S., Khan, A., Pujol, M. V., LaRussa, V. F., Lancaster, L. H., Rosen, G. D., Fishman, J., Mageto, Y. N., Mendizabal, A., & Hare, J. M. (2017). Allogeneic human Mesenchymal stem cells in patients with idiopathic pulmonary fibrosis via intravenous delivery (AETHER): A phase I safety clinical trial. *Chest*, 151(5), 971–981. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2016.10.061>.
 31. Gu, W., Song, L., Li, X. M., Wang, D., Guo, X. J., & Xu, W. G. (2015). Mesenchymal stem cells alleviate airway inflammation and emphysema in COPD through down-regulation of cyclooxygenase-2 via p38 and ERK MAPK pathways. *Scientific Reports*, 5, 8733. <https://doi.org/10.1038/srep08733>.
 32. Li, X., Michaeloudes, C., Zhang, Y., Wiegman, C. H., Adcock, I. M., Lian, Q., et al. (2018). Mesenchymal stem cells alleviate oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction in the airways. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(5), 1634–1645.e1635. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.017>.
 33. Hao, Q., Gudapati, V., Monsel, A., Park, J. H., Hu, S., Kato, H., Lee, J. H., Zhou, L., He, H., & Lee, J. W. (2019). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles decrease lung injury in mice. *Journal of Immunology*, 203(7), 1961–1972. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801534>.
 34. Ahn, S. Y., Park, W. S., Kim, Y. E., Sung, D. K., Sung, S. I., Ahn, J. Y., & Chang, Y. S. (2018). Vascular endothelial growth factor mediates the therapeutic efficacy of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles against neonatal hyperoxic lung injury. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(4), 26. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0055-8>.
 35. Mariñas-Pardo, L., Mirones, I., Amor-Carro, O., Fraga-Iriso, R., Lena-Costa, B., Cubillo, I., Rodríguez Milla, M. Á., García-Castro, J., & Ramos-Barbón, D. (2014). Mesenchymal stem cells regulate airway contractile tissue remodeling in murine experimental asthma. *Allergy*, 69(6), 730–740. <https://doi.org/10.1111/all.12392>.
 36. Kapoor, S., Patel, S. A., Kartan, S., Axelrod, D., Capitle, E., & Rameshwar, P. (2012). Tolerance-like mediated suppression by mesenchymal stem cells in patients with dust mite allergy-induced asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(4), 1094–1101. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.10.048>.
 37. Akdis, C. A. (2012). Therapies for allergic inflammation: Refining strategies to induce tolerance. *Nature Medicine*, 18(5), 736–749. <https://doi.org/10.1038/nm.2754>.
 38. Bames, P. J. (2012). Severe asthma: Advances in current management and future therapy. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(1), 48–59. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.11.006>.
 39. Corren, J. (2019). New targeted therapies for uncontrolled asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice*, 7(5), 1394–1403. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.03.022>.
 40. Agache, I., Rocha, C., Beltran, J., Song, Y., Posso, M., Solà, I., Alonso-Coello, P., Akdis, C., Akdis, M., Canonica, G. W., Casale, T., Chivato, T., Corren, J., del Giacco, S., Eiwegger, T., Firinu, D., Gem, J. E., Hamelmann, E., Hanania, N., Mäkelä, M., Martin, I. H., Nair, P., O'Mahony, L., Papadopoulos, N. G., Papi, A., Park, H. S., Pérez de Llano, L., Quirce, S., Sastre, J., Shamji, M., Schwarze, J., Canelo-Aybar, C., Palomares, O., & Jutel, M. (2020). Efficacy and safety of treatment with biologicals (benralizumab, dupilumab and omalizumab) for severe allergic asthma: A systematic review for the EAACI guidelines - recommendations on the use of biologicals in severe asthma. *Allergy*, 75(5), 1043–1057. <https://doi.org/10.1111/all.14235>.
 41. Agache, I., Lau, S., Akdis, C. A., Smolinska, S., Bonini, M., Cavkaytar, O., Flood, B., Gajdanowicz, P., Izuhara, K., Kalayci, O., Mosges, R., Palomares, O., Papadopoulos, N. G., Sokolowska, M., Angier, E., Fernandez-Rivas, M., Pajno, G., Pfiar, O., Roberts, G. C., Ryan, D., Sturm, G. J., Ree, R., Varga, E. M., Wijk, R. G., Yepes-Nuñez, J. J., & Jutel, M. (2019). EAACI guidelines on allergen immunotherapy: House dust mite-driven allergic asthma. *Allergy*, 74(5), 855–873. <https://doi.org/10.1111/all.13749>.
 42. Corren, J., Castro, M., O'Riordan, T., Hanania, N. A., Pavord, I. D., Quirce, S., Chipps, B. E., Wenzel, S. E., Thangavelu, K., Rice, M. S., Harel, S., Jagerschmidt, A., Khan, A. H., Kamat, S., Maroni, J., Rowe, P., Lu, Y., Amin, N., Pirozzi, G., Ruddy, M., Graham, N. M. H., & Teper, A. (2020). Dupilumab efficacy in patients with uncontrolled, moderate-to-severe allergic asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology. In Practice*, 8(2), 516–526. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2019.08.050>.
 43. Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 9(5), 641–650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>.
 44. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143–147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>.
 45. Caplan, A. I. (2017). Mesenchymal stem cells: Time to change the name! *Stem Cells Translational Medicine*, 6(6), 1445–1451. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051>.
 46. Han, S. M., Han, S. H., Koh, Y. R., Jang, G., Chan Ra, J., Kang, S. K., Lee, H. W., & Youn, H. Y. (2014). Enhanced proliferation and differentiation of Oct4- and Sox2-overexpressing human adipose

- tissue mesenchymal stem cells. *Experimental & Molecular Medicine*, 46, e101. <https://doi.org/10.1038/emm.2014.28>.
47. Krampera, M., Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Laylor, R., Simpson, E., & Dazzi, F. (2003). Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, 101(9), 3722–3729. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-2104>.
 48. Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P. J., Lam, E. W., & Dazzi, F. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, 105(7), 2821–2827. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3696>.
 49. Wang, H. S., Hung, S. C., Peng, S. T., Huang, C. C., Wei, H. M., Guo, Y. J., Fu, Y. S., Lai, M. C., & Chen, C. C. (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, 22(7), 1330–1337. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0013>.
 50. Lee, O. K., Kuo, T. K., Chen, W. M., Lee, K. D., Hsieh, S. L., & Chen, T. H. (2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 103(5), 1669–1675. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1670>.
 51. Bieback, K., Kem, S., Klüter, H., & Eichler, H. (2004). Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*, 22(4), 625–634. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-4-625>.
 52. Roubelakis, M. G., Pappa, K. I., Bitsika, V., Zagoura, D., Vlahou, A., Papadaki, H. A., Antsaklis, A., & Anagnostou, N. P. (2007). Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: Comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 16(6), 931–952. <https://doi.org/10.1089/scd.2007.0036>.
 53. Savickiene, J., Treigyte, G., Baronaite, S., Valiulienė, G., Kaupinis, A., Valius, M., Arlauskienė, A., & Navakauskienė, R. (2015). Human amniotic fluid Mesenchymal stem cells from second- and third-trimester amniocentesis: Differentiation potential, molecular signature, and proteome analysis. *Stem Cells International*, 2015, 319238–319215. <https://doi.org/10.1155/2015/319238>.
 54. Tsai, M. S., Hwang, S. M., Chen, K. D., Lee, Y. S., Hsu, L. W., Chang, Y. J., Wang, C. N., Peng, H. H., Chang, Y. L., Chao, A. S., Chang, S. D., Lee, K. D., Wang, T. H., Wang, H. S., & Soong, Y. K. (2007). Functional network analysis of the transcriptomes of mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid, amniotic membrane, cord blood, and bone marrow. *Stem Cells*, 25(10), 2511–2523. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0023>.
 55. Shi, S., & Gronthos, S. (2003). Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(4), 696–704. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.4.696>.
 56. Schüring, A. N., Schulte, N., Kelsch, R., Röpke, A., Kiesel, L., & Götte, M. (2011). Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. *Fertility and Sterility*, 95(1), 423–426. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.08.035>.
 57. Meng, X., Ichim, T. E., Zhong, J., Rogers, A., Yin, Z., Jackson, J., Wang, H., Ge, W., Bogin, V., Chan, K. W., Thébaud, B., & Riordan, N. H. (2007). Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *Journal of Translational Medicine*, 5, 57. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-5-57>.
 58. Tondreau, T., Meuleman, N., Delforge, A., Dejeneffe, M., Leroy, R., Massy, M., Mortier, C., Bron, D., & Lagneaux, L. (2005). Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: Proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells*, 23(8), 1105–1112. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0330>.
 59. Wang, S. J., Jiang, D., Zhang, Z. Z., Huang, A. B., Qi, Y. S., Wang, H. J., Zhang, J. Y., & Yu, J. K. (2016). Chondrogenic potential of peripheral blood derived Mesenchymal stem cells seeded on demineralized Cancellous bone scaffolds. *Scientific Reports*, 6, 36400. <https://doi.org/10.1038/srep36400>.
 60. Xu, J., Su, Y., Hu, L., Cain, A., Gu, Y., Liu, B., Wu, R., Wang, S., & Wang, H. (2018). Effect of bone morphogenetic protein 6 on Immunomodulatory functions of salivary gland-derived Mesenchymal stem cells in Sjögren's syndrome. *Stem Cells and Development*, 27(22), 1540–1548. <https://doi.org/10.1089/scd.2017.0161>.
 61. de Sousa, E. B., Casado, P. L., Moura Neto, V., Duarte, M. E., & Aguiar, D. P. (2014). Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: Latest discoveries and therapeutic perspectives. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(5), 112. <https://doi.org/10.1186/sct501>.
 62. Liu, T. M., Martina, M., Huttmacher, D. W., Hui, J. H., Lee, E. H., & Lim, B. (2007). Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells*, 25(3), 750–760. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0394>.
 63. Viswanathan, S., Shi, Y., Galipeau, J., Krampera, M., Leblanc, K., Martin, I., Nolte, J., Phinney, D. G., & Sensebe, L. (2019). Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & gene therapy (ISCT®) Mesenchymal stromal cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy*, 21(10), 1019–1024. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2019.08.002>.
 64. Mattar, P., & Bieback, K. (2015). Comparing the Immunomodulatory properties of bone marrow, adipose tissue, and birth-associated tissue Mesenchymal stromal cells. *Frontiers in Immunology*, 6, 560. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00560>.
 65. Ribeiro, A., Laranjeira, P., Mendes, S., Velada, I., Leite, C., Andrade, P., Santos, F., Henriques, A., Grãos, M., Cardoso, C. M. P., Martinho, A., Pais, M. L., da Silva, C., Cabral, J., Trindade, H., & Paiva, A. (2013). Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(5), 125. <https://doi.org/10.1186/sct336>.
 66. Najar, M., Raicevic, G., Boufker, H. I., Fayyad Kazan, H., De Bruyn, C., Meuleman, N., et al. (2010). Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's jelly and bone marrow sources. *Cellular Immunology*, 264(2), 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2010.06.006>.
 67. Ivanova-Todorova, E., Bochev, I., Mourdjeva, M., Dimitrov, R., Bukarev, D., Kyurkchiev, S., Tivchev, P., Altunkova, I., & Kyurkchiev, D. S. (2009). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunology Letters*, 126(1–2), 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.07.010>.
 68. Jin, H. J., Bae, Y. K., Kim, M., Kwon, S. J., Jeon, H. B., Choi, S. J., et al. (2013). Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 17986–18001. <https://doi.org/10.3390/ijms140917986>.
 69. Li, X., Bai, J., Ji, X., Li, R., Xuan, Y., & Wang, Y. (2014). Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. *International Journal of Molecular Medicine*, 34(3), 695–704. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1821>.
 70. Adams, T. S., Schupp, J. C., Poli, S., Ayaub, E. A., Neumark, N., Ahangari, F., et al. (2020). Single-cell RNA-seq reveals ectopic

- and aberrant lung-resident cell populations in idiopathic pulmonary fibrosis. *Science Advances*, 6(28), eaba1983. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba1983>.
71. Habermann, A. C., Gutierrez, A. J., Bui, L. T., Yahn, S. L., Winters, N. I., Calvi, C. L., et al. (2020). Single-cell RNA sequencing reveals profibrotic roles of distinct epithelial and mesenchymal lineages in pulmonary fibrosis. *Science Advances*, 6(28), eaba1972. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba1972>.
 72. Wang, L., Shi, M., Tong, L., Wang, J., Ji, S., Bi, J., Chen, C., Jiang, J., Bai, C., Zhou, J., & Song, Y. (2019). Lung-resident Mesenchymal stem cells promote repair of LPS-induced acute lung injury via regulating the balance of regulatory T cells and Th17 cells. *Inflammation*, 42(1), 199–210. <https://doi.org/10.1007/s10753-018-0884-6>.
 73. Tong, L., Zhou, J., Rong, L., Seeley, E. J., Pan, J., Zhu, X., Liu, J., Wang, Q., Tang, X., Qu, J., Bai, C., & Song, Y. (2016). Fibroblast growth factor-10 (FGF-10) mobilizes lung-resident Mesenchymal stem cells and protects against acute lung injury. *Scientific Reports*, 6, 21642. <https://doi.org/10.1038/srep21642>.
 74. Lu, Z., Chang, W., Meng, S., Xu, X., Xie, J., Guo, F., Yang, Y., Qiu, H., & Liu, L. (2019). Mesenchymal stem cells induce dendritic cell immune tolerance via paracrine hepatocyte growth factor to alleviate acute lung injury. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 372. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1488-2>.
 75. Rolandsson Enes, S., Andersson Sjöland, A., Skog, I., Hansson, L., Larsson, H., Le Blanc, K., et al. (2016). MSC from fetal and adult lungs possess lung-specific properties compared to bone marrow-derived MSC. *Scientific Reports*, 6, 29160. <https://doi.org/10.1038/srep29160>.
 76. Cao, H., Wang, C., Chen, X., Hou, J., Xiang, Z., Shen, Y., & Han, X. (2018). Inhibition of Wnt/ β -catenin signaling suppresses myofibroblast differentiation of lung resident mesenchymal stem cells and pulmonary fibrosis. *Scientific Reports*, 8(1), 13644. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28968-9>.
 77. Cao, H., Chen, X., Hou, J., Wang, C., Xiang, Z., Shen, Y., & Han, X. (2020). The Shh/Gli signaling cascade regulates myofibroblastic activation of lung-resident mesenchymal stem cells via the modulation of Wnt10a expression during pulmonary fibrogenesis. *Laboratory Investigation*, 100(3), 363–377. <https://doi.org/10.1038/s41374-019-0316-8>.
 78. Shi, C., Cao, X., Chen, X., Sun, Z., Xiang, Z., Zhao, H., Qian, W., & Han, X. (2015). Intracellular surface-enhanced Raman scattering probes based on TAT peptide-conjugated Au nanostars for distinguishing the differentiation of lung resident mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 58, 10–25. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.04.010>.
 79. Hynes, K., Menicanin, D., Mrozik, K., Gronthos, S., & Bartold, P. M. (2014). Generation of functional mesenchymal stem cells from different induced pluripotent stem cell lines. *Stem Cells and Development*, 23(10), 1084–1096. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0111>.
 80. Tang, M., Chen, W., Liu, J., Weir, M. D., Cheng, L., & Xu, H. H. (2014). Human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cell seeding on calcium phosphate scaffold for bone regeneration. *Tissue Engineering. Part A*, 20(7–8), 1295–1305. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2013.0211>.
 81. Pinto, D. S., Ahsan, T., Serra, J., Fernandes-Platzgummer, A., Cabral, J. M. S., & da Silva, C. L. (2020). Modulation of the in vitro angiogenic potential of human mesenchymal stromal cells from different tissue sources. *Journal of Cellular Physiology*, 235(10), 7224–7238. <https://doi.org/10.1002/jcp.29622>.
 82. Soontarak, S., Chow, L., Johnson, V., Coy, J., Wheat, W., Regan, D., & Dow, S. (2018). Mesenchymal stem cells (MSC) derived from induced pluripotent stem cells (iPSC) equivalent to adipose-derived MSC in promoting intestinal healing and microbiome normalization in mouse inflammatory bowel disease model. *Stem Cells Translational Medicine*, 7(6), 456–467. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0305>.
 83. Yoshihama, M., Hayashizaki, Y., & Murakawa, Y. (2017). Genomic instability of iPSCs: Challenges towards their clinical applications. *Stem Cell Reviews and Reports*, 13(1), 7–16. <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9680-6>.
 84. A Study of CYP-001 for the Treatment of Steroid-Resistant Acute Graft Versus Host Disease (2016). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02923375?term=cyp-001&draw=2&rank=1>. Accessed December 9, 2020.
 85. The MEdNchymal covid-19 Trial: a Pilot Study to Investigate Early Efficacy of MSCs in Adults With COVID-19 (MEND) (2020). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04537351?term=cyp-001&draw=2&rank=2>. Accessed December 9, 2020.
 86. Yao, Y., Fan, X. L., Jiang, D., Zhang, Y., Li, X., Xu, Z. B., Fang, S. B., Chiu, S., Tse, H. F., Lian, Q., & Fu, Q. L. (2018). Connexin 43-mediated mitochondrial transfer of iPSC-MSCs alleviates asthma inflammation. *Stem Cell Reports*, 11(5), 1120–1135. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.09.012>.
 87. Royce, S. G., Mao, W., Lim, R., Kelly, K., & Samuel, C. S. (2019). iPSC- and mesenchymangioblast-derived mesenchymal stem cells provide greater protection against experimental chronic allergic airways disease compared with a clinically used corticosteroid. *The FASEB Journal*, 33(5), 6402–6411. <https://doi.org/10.1096/fj.201802307R>.
 88. Royce, S. G., Rele, S., Broughton, B. R. S., Kelly, K., & Samuel, C. S. (2017). Intranasal administration of mesenchymangioblast-derived mesenchymal stem cells abrogates airway fibrosis and airway hyperresponsiveness associated with chronic allergic airways disease. *The FASEB Journal*, 31(9), 4168–4178. <https://doi.org/10.1096/fj.201700178R>.
 89. Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A. I., Zhao, R. C., & Shi, Y. (2008). Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*, 2(2), 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.11.014>.
 90. Sudres, M., Norol, F., Trenado, A., Grégoire, S., Charlotte, F., Levacher, B., Lataillade, J. J., Bourin, P., Holy, X., Vemant, J. P., Klatzmann, D., & Cohen, J. L. (2006). Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *Journal of Immunology*, 176(12), 7761–7767. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.12.7761>.
 91. Zappia, E., Casazza, S., Pedemonte, E., Benvenuto, F., Bonanni, I., Gerdoni, E., Giunti, D., Ceravolo, A., Cazzanti, F., Frassonni, F., Mancardi, G., & Uccelli, A. (2005). Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*, 106(5), 1755–1761. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1496>.
 92. Zhou, Y., Day, A., Haykal, S., Keating, A., & Waddell, T. K. (2013). Mesenchymal stromal cells augment CD4+ and CD8+ T-cell proliferation through a CCL2 pathway. *Cytotherapy*, 15(10), 1195–1207. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.05.009>.
 93. Deng, Y., Zhang, Y., Ye, L., Zhang, T., Cheng, J., Chen, G., Zhang, Q., & Yang, Y. (2016). Umbilical cord-derived Mesenchymal stem cells instruct monocytes towards an IL10-producing phenotype by secreting IL6 and HGF. *Scientific Reports*, 6, 37566. <https://doi.org/10.1038/srep37566>.
 94. Luz-Crawford, P., Kurte, M., Bravo-Alegria, J., Contreras, R., Nova-Lamperti, E., Tejedor, G., Noël, D., Jorgensen, C., Figueroa, F., Djouad, F., & Carrión, F. (2013). Mesenchymal stem cells generate a CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(3), 65. <https://doi.org/10.1186/scrt216>.
 95. Sheng, H., Wang, Y., Jin, Y., Zhang, Q., Zhang, Y., Wang, L., Shen, B., Yin, S., Liu, W., Cui, L., & Li, N. (2008). A critical role

- of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Research*, 18(8), 846–857. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.80>.
96. Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M. C., & Moretta, L. (2006). Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: Evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*, 107(4), 1484–1490. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-07-2775>.
 97. Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M. C., & Moretta, L. (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: Role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*, 111(3), 1327–1333. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-02-074997>.
 98. Luz-Crawford, P., Djouad, F., Toupet, K., Bony, C., Franquesa, M., Hoogduijn, M. J., Jorgensen, C., & Noël, D. (2016). Mesenchymal stem cell-derived interleukin 1 receptor antagonist promotes macrophage polarization and inhibits B cell differentiation. *Stem Cells*, 34(2), 483–492. <https://doi.org/10.1002/stem.2254>.
 99. Rosado, M. M., Bernardo, M. E., Scarsella, M., Conforti, A., Giorda, E., Biagini, S., Cascioli, S., Rossi, F., Guzzo, I., Vivarelli, M., dello Strologo, L., Emma, F., Locatelli, F., & Casetti, R. (2015). Inhibition of B-cell proliferation and antibody production by mesenchymal stromal cells is mediated by T cells. *Stem Cells and Development*, 24(1), 93–103. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0155>.
 100. Zhou, H., Guo, M., Bian, C., Sun, Z., Yang, Z., Zeng, Y., Ai, H. S., & Zhao, R. C. (2010). Efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of scleroderma chronic graft-versus-host disease: Clinical report. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 16(3), 403–412. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2009.11.006>.
 101. Duijvestein, M., Vos, A. C., Roelofs, H., Wildenberg, M. E., Wendrich, B. B., Verspaget, H. W., et al. (2010). Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: Results of a phase I study. *Gut*, 59(12), 1662–1669. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.215152>.
 102. Wang, D., Li, J., Zhang, Y., Zhang, M., Chen, J., Li, X., Hu, X., Jiang, S., Shi, S., & Sun, L. (2014). Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in active and refractory systemic lupus erythematosus: A multicenter clinical study. *Arthritis Research & Therapy*, 16(2), R79. <https://doi.org/10.1186/ar4520>.
 103. Kim, Y., Jin, H. J., Heo, J., Ju, H., Lee, H. Y., Kim, S., Lee, S., Lim, J., Jeong, S. Y., Kwon, J. H., Kim, M., Choi, S. J., Oh, W., Yang, Y. S., Hwang, H. H., Yu, H. Y., Ryu, C. M., Jeon, H. B., & Shin, D. M. (2018). Small hypoxia-primed mesenchymal stem cells attenuate graft-versus-host disease. *Leukemia*, 32(12), 2672–2684. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0151-8>.
 104. Wateman, R. S., Tomchuck, S. L., Henkle, S. L., & Betancourt, A. M. (2010). A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*, 5(4), e10088. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010088>.
 105. Lee, S. C., Jeong, H. J., Lee, S. K., & Kim, S. J. (2015). Lipopolysaccharide preconditioning of adipose-derived stem cells improves liver-regenerating activity of the secretome. *Stem Cell Research & Therapy*, 6, 75. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0072-7>.
 106. Noone, C., Kihm, A., English, K., O'Dea, S., & Mahon, B. P. (2013). IFN- γ stimulated human umbilical-tissue-derived cells potently suppress NK activation and resist NK-mediated cytotoxicity in vitro. *Stem Cells and Development*, 22(22), 3003–3014. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0028>.
 107. Francois, M., Romieu-Mourez, R., Li, M., & Galipeau, J. (2012). Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Molecular Therapy*, 20(1), 187–195. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.189>.
 108. Sivanathan, K. N., Rojas-Canales, D. M., Hope, C. M., Krishnan, R., Carroll, R. P., Gronthos, S., Grey, S. T., & Coates, P. T. (2015). Interleukin-17A-induced human Mesenchymal stem cells are superior modulators of immunological function. *Stem Cells*, 33(9), 2850–2863. <https://doi.org/10.1002/stem.2075>.
 109. Benvenuto, F., Ferrari, S., Gerdoni, E., Gualandi, F., Frassoni, F., Pistoia, V., Mancardi, G., & Uccelli, A. (2007). Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells*, 25(7), 1753–1760. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0068>.
 110. Pevsner-Fischer, M., Morad, V., Cohen-Sfady, M., Rouso-Noori, L., Zanin-Zhorov, A., Cohen, S., Cohen, I. R., & Zipori, D. (2007). Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood*, 109(4), 1422–1432. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-028704>.
 111. Gao, F., Chiu, S. M., Motan, D. A., Zhang, Z., Chen, L., Ji, H. L., et al. (2016). Mesenchymal stem cells and immunomodulation: Current status and future prospects. *Cell Death & Disease*, 7, e2062. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.327>.
 112. Fang, S. B., Zhang, H. Y., Wang, C., He, B. X., Liu, X. Q., Meng, X. C., Peng, Y. Q., Xu, Z. B., Fan, X. L., Wu, Z. J., Chen, D., Zheng, L., Zheng, S. G., & Fu, Q. L. (2020). Small extracellular vesicles derived from human mesenchymal stromal cells prevent group 2 innate lymphoid cell-dominant allergic airway inflammation through delivery of miR-146a-5p. *J Extracell Vesicles*, 9(1), 1723260. <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1723260>.
 113. Li, Y., Zhang, D., Xu, L., Dong, L., Zheng, J., Lin, Y., Huang, J., Zhang, Y., Tao, Y., Zang, X., Li, D., & du, M. (2019). Cell-cell contact with proinflammatory macrophages enhances the immunotherapeutic effect of mesenchymal stem cells in two abortion models. *Cellular & Molecular Immunology*, 16(12), 908–920. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0204-6>.
 114. Ni, K., Liu, M., Zheng, J., Wen, L., Chen, Q., Xiang, Z., Lam, K. T., Liu, Y., Chan, G. C. F., Lau, Y. L., & Tu, W. (2018). PD-1/PD-L1 pathway mediates the alleviation of pulmonary fibrosis by human Mesenchymal stem cells in humanized mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 58(6), 684–695. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0326OC>.
 115. Li, H., Wang, W., Wang, G., Hou, Y., Xu, F., Liu, R., Wang, F., Xue, J., Hu, T., & Luan, X. (2015). Interferon- γ and tumor necrosis factor- α promote the ability of human placenta-derived mesenchymal stromal cells to express programmed death ligand-2 and induce the differentiation of CD4(+)interleukin-10(+) and CD8(+)interleukin-10(+)Treg subsets. *Cytotherapy*, 17(11), 1560–1571. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.07.018>.
 116. Singh, A. K., Stock, P., & Akbari, O. (2011). Role of PD-L1 and PD-L2 in allergic diseases and asthma. *Allergy*, 66(2), 155–162. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02458.x>.
 117. Wang, W. B., Yen, M. L., Liu, K. J., Hsu, P. J., Lin, M. H., Chen, P. M., Sudhir, P. R., Chen, C. H., Chen, C. H., Sytwu, H. K., & Yen, B. L. (2015). Interleukin-25 mediates transcriptional control of PD-L1 via STAT3 in multipotent human Mesenchymal stromal cells (hMSCs) to suppress Th17 responses. *Stem Cell Reports*, 5(3), 392–404. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.07.013>.
 118. Azevedo, R. I., Minskaia, E., Fernandes-Platzgummer, A., Vieira, A. I. S., da Silva, C. L., Cabral, J. M. S., & Lacerda, J. F. (2020). Mesenchymal stromal cells induce regulatory T cells via epigenetic conversion of human conventional CD4 T cells in vitro. *Stem Cells*, 38(8), 1007–1019. <https://doi.org/10.1002/stem.3185>.
 119. Lee, H. J., Kim, S. N., Jeon, M. S., Yi, T., & Song, S. U. (2017). ICOSL expression in human bone marrow-derived mesenchymal

- stem cells promotes induction of regulatory T cells. *Scientific Reports*, 7, 44486. <https://doi.org/10.1038/srep44486>.
120. Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., Romagnani, P., Maggi, E., Romagnani, S., & Annunziato, F. (2006). Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24(2), 386–398. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0008>.
 121. Giesecke, F., Böhlinger, J., Bussolari, R., Dominici, M., Handgretinger, R., & Müller, I. (2010). Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood*, 116(19), 3770–3779. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-270777>.
 122. Chinnadurai, R., Copland, I. B., Patel, S. R., & Galipeau, J. (2014). IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN- γ -licensed human mesenchymal stromal cells. *Journal of Immunology*, 192(4), 1491–1501. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301828>.
 123. Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., L'Huillier, A., Ling, W., Roberts, A. I., le, A. D., Shi, S., Shao, C., & Shi, Y. (2010). Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *Journal of Immunology*, 184(5), 2321–2328. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902023>.
 124. Schena, F., Gambini, C., Gregorio, A., Mosconi, M., Reverberi, D., Gattorno, M., Casazza, S., Uccelli, A., Moretta, L., Martini, A., & Traggiai, E. (2010). Interferon- γ -dependent inhibition of B cell activation by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 62(9), 2776–2786. <https://doi.org/10.1002/art.27560>.
 125. Luk, F., Carreras-Planella, L., Korevaar, S. S., de Witte, S. F. H., Borrás, F. E., Betjes, M. G. H., Baan, C. C., Hoogduijn, M. J., & Franquesa, M. (2017). Inflammatory conditions dictate the effect of Mesenchymal stem or stromal cells on B cell function. *Frontiers in Immunology*, 8, 1042. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01042>.
 126. Luk, F., de Witte, S. F., Korevaar, S. S., Roemeling-van Rhijn, M., Franquesa, M., Strini, T., et al. (2016). Inactivated Mesenchymal stem cells maintain immunomodulatory capacity. *Stem Cells and Development*, 25(18), 1342–1354. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0068>.
 127. Li, W., Ren, G., Huang, Y., Su, J., Han, Y., Li, J., Chen, X., Cao, K., Chen, Q., Shou, P., Zhang, L., Yuan, Z. R., Roberts, A. I., Shi, S., le, A. D., & Shi, Y. (2012). Mesenchymal stem cells: A double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death and Differentiation*, 19(9), 1505–1513. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.26>.
 128. Peng, Y., Chen, X., Liu, Q., Zhang, X., Huang, K., Liu, L., Li, H., Zhou, M., Huang, F., Fan, Z., Sun, J., Liu, Q., Ke, M., Li, X., Zhang, Q., & Xiang, A. P. (2015). Mesenchymal stromal cells infusions improve refractory chronic graft versus host disease through an increase of CD5+ regulatory B cells producing interleukin 10. *Leukemia*, 29(3), 636–646. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.225>.
 129. Kim, J., & Hematti, P. (2009). Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental Hematology*, 37(12), 1445–1453. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2009.09.004>.
 130. Mougiakakos, D., Jitschin, R., Johansson, C. C., Okita, R., Kiessling, R., & Le Blanc, K. (2011). The impact of inflammatory licensing on heme oxygenase-1-mediated induction of regulatory T cells by human mesenchymal stem cells. *Blood*, 117(18), 4826–4835. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-324038>.
 131. Li, Y. P., Paczesny, S., Lauret, E., Poirault, S., Bordignon, P., Mekhloufi, F., Hequet, O., Bertrand, Y., Ou-Yang, J. P., Stoltz, J. F., Miossec, P., & Eljaafari, A. (2008). Human mesenchymal stem cells license adult CD34+ hemopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the notch pathway. *Journal of Immunology*, 180(3), 1598–1608. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1598>.
 132. Djouad, F., Charbonnier, L. M., Bouffi, C., Louis-Plence, P., Bony, C., Apparailly, F., Cantos, C., Jorgensen, C., & Noël, D. (2007). Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells*, 25(8), 2025–2032. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0548>.
 133. Zhong, Z., Chen, A., Fa, Z., Ding, Z., Xiao, L., Wu, G., Wang, Q., & Zhang, R. (2020). Bone marrow mesenchymal stem cells up-regulate PI3K/AKT pathway and down-regulate NF- κ B pathway by secreting glial cell-derived neurotrophic factors to regulate microglial polarization and alleviate deafferentation pain in rats. *Neurobiology of Disease*, 143, 104945. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104945>.
 134. Sgrignoli, M. R., Silva, D. A., Nascimento, F. F., Sgrignoli, D. A. M., Nai, G. A., da Silva, M. G., de Barros, M. A., Bittencourt, M. K. W., de Moraes, B. P., Dinallo, H. R., Foglia, B. T. D., Cabrera, W. B., Fares, E. C., & Andrade, S. F. (2019). Reduction in the inflammatory markers CD4, IL-1, IL-6 and TNF α in dogs with keratoconjunctivitis sicca treated topically with mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research*, 39, 101525. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101525>.
 135. Shi, B., Qi, J., Yao, G., Feng, R., Zhang, Z., Wang, D., Chen, C., Tang, X., Lu, L., Chen, W., & Sun, L. (2018). Mesenchymal stem cell transplantation ameliorates Sjögren's syndrome via suppressing IL-12 production by dendritic cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), 308. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1023-x>.
 136. Chatterjee, D., Marquardt, N., Tufa, D. M., Hatlapatka, T., Hass, R., Kasper, C., von Kaisenberg, C., Schmidt, R. E., & Jacobs, R. (2014). Human umbilical cord-derived Mesenchymal stem cells utilize Activin-a to suppress interferon- γ production by natural killer cells. *Frontiers in Immunology*, 5, 662. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00662>.
 137. Abumaree, M. H., Al Jumah, M. A., Kalionis, B., Jawdat, D., Al Khaldi, A., Abomary, F. M., et al. (2013). Human placental mesenchymal stem cells (pMSCs) play a role as immune suppressive cells by shifting macrophage differentiation from inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 macrophages. *Stem Cell Reviews and Reports*, 9(5), 620–641. <https://doi.org/10.1007/s12015-013-9455-2>.
 138. Lim, J. Y., Im, K. I., Lee, E. S., Kim, N., Nam, Y. S., Jeon, Y. W., & Cho, S. G. (2016). Enhanced immunoregulation of mesenchymal stem cells by IL-10-producing type 1 regulatory T cells in collagen-induced arthritis. *Scientific Reports*, 6, 26851. <https://doi.org/10.1038/srep26851>.
 139. Dong, J., Wong, C. K., Cai, Z., Jiao, D., Chu, M., & Lam, C. W. (2015). Amelioration of allergic airway inflammation in mice by regulatory IL-35 through dampening inflammatory dendritic cells. *Allergy*, 70(8), 921–932. <https://doi.org/10.1111/all.12631>.
 140. Whitehead, G. S., Wilson, R. H., Nakano, K., Burch, L. H., Nakano, H., & Cook, D. N. (2012). IL-35 production by inducible costimulator (ICOS)-positive regulatory T cells reverses established IL-17-dependent allergic airways disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(1), 207–215.e201–205. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.08.009>.
 141. Cho, K. A., Lee, J. K., Kim, Y. H., Park, M., Woo, S. Y., & Ryu, K. H. (2017). Mesenchymal stem cells ameliorate B-cell-mediated immune responses and increase IL-10-expressing regulatory B cells in an EB13-dependent manner. *Cellular & Molecular Immunology*, 14, 895–908. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.59>.

142. O'Garra, A., Stockinger, B., & Veldhoen, M. (2008). Differentiation of human T(H)-17 cells does require TGF-beta1. *Nature Immunology*, 9(6), 588–590. <https://doi.org/10.1038/ni0608-588>.
143. Battle, E., & Massagué, J. (2019). Transforming growth factor-β signaling in immunity and cancer. *Immunity*, 50(4), 924–940. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.024>.
144. Zhou, L., Lopes, J. E., Chong, M. M., Ivanov, I. I., Min, R., Victoria, G. D., et al. (2008). TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma1 function. *Nature*, 453(7192), 236–240. <https://doi.org/10.1038/nature06878>.
145. Gong, D., Shi, W., Yi, S. J., Chen, H., Groffen, J., & Heisterkamp, N. (2012). TGFβ signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation. *BMC Immunology*, 13, 31. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-13-31>.
146. Paun, A., Bergeron, M. E., & Haston, C. K. (2017). The Th1/Th17 balance dictates the fibrosis response in murine radiation-induced lung disease. *Scientific Reports*, 7(1), 11586. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11656-5>.
147. Ratajczak, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., & Ratajczak, M. Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 20(5), 847–856. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404132>.
148. Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A., & Ratajczak, M. Z. (2006). Membrane-derived microvesicles: Important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia*, 20(9), 1487–1495. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404296>.
149. Ratajczak, M. Z., & Ratajczak, J. (2020). Extracellular microvesicles/exosomes: Discovery, disbelief, acceptance, and the future? *Leukemia*, 34, 3126–3135. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-01041-z>.
150. Phinney, D. G., Di Giuseppe, M., Njah, J., Sala, E., Shiva, S., St Croix, C. M., et al. (2015). Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs. *Nature Communications*, 6, 8472. <https://doi.org/10.1038/ncomms9472>.
151. Kim, H. S., Choi, D. Y., Yun, S. J., Choi, S. M., Kang, J. W., Jung, J. W., Hwang, D., Kim, K. P., & Kim, D. W. (2012). Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. *Journal of Proteome Research*, 11(2), 839–849. <https://doi.org/10.1021/pr200682z>.
152. Du, T., Zou, X., Cheng, J., Wu, S., Zhong, L., Ju, G., et al. (2013). Human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells reduce renal fibrosis through induction of native and foreign hepatocyte growth factor synthesis in injured tubular epithelial cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(3), 59. <https://doi.org/10.1186/scrt215>.
153. Aggarwal, S., & Pittenger, M. F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105(4), 1815–1822. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1559>.
154. Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanesi, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., et al. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or noncellular mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10), 3838–3843. <https://doi.org/10.1182/blood.v99.10.3838>.
155. Hwu, P., Du, M. X., Lapointe, R., Do, M., Taylor, M. W., & Young, H. A. (2000). Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *Journal of Immunology*, 164(7), 3596–3599. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.7.3596>.
156. Harting, M. T., Srivastava, A. K., Zhaorigetu, S., Bair, H., Prabhakara, K. S., Toledano Furman, N. E., Vykoukal, J. V., Ruppert, K. A., Cox Jr., C. S., & Olson, S. D. (2018). Inflammation-stimulated Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles attenuate inflammation. *Stem Cells*, 36(1), 79–90. <https://doi.org/10.1002/stem.2730>.
157. Wu, S., Ju, G. Q., Du, T., Zhu, Y. J., & Liu, G. H. (2013). Microvesicles derived from human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells attenuate bladder tumor cell growth in vitro and in vivo. *PLoS One*, 8(4), e61366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061366>.
158. Di Trapani, M., Bassi, G., Midolo, M., Gatti, A., Kamga, P. T., Cassaro, A., et al. (2016). Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions. *Scientific Reports*, 6, 24120. <https://doi.org/10.1038/srep24120>.
159. Thomi, G., Surbek, D., Haesler, V., Joeger-Messerli, M., & Schoeberlein, A. (2019). Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells reduce microglia-mediated neuroinflammation in perinatal brain injury. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 105. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1207-z>.
160. Zhu, H., Lan, L., Zhang, Y., Chen, Q., Zeng, Y., Luo, X., Ren, J., Chen, S., Xiao, M., Lin, K., Chen, M., Li, Q., Chen, Y., Xu, J., Zheng, Z., Chen, Z., Xie, Y., Hu, J., & Yang, T. (2020). Epidermal growth factor stimulates exosomal microRNA-21 derived from mesenchymal stem cells to ameliorate aGVHD by modulating regulatory T cells. *The FASEB Journal*, 34(6), 7372–7386. <https://doi.org/10.1096/fj.20190847RRR>.
161. Reis, M., Mavin, E., Nicholson, L., Green, K., Dickinson, A. M., & Wang, X. N. (2018). Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles attenuate dendritic cell maturation and function. *Frontiers in Immunology*, 9, 2538. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02538>.
162. Shahir, M., Mahmoud Hashemi, S., Asadirad, A., Varahram, M., Kazempour-Dizaji, M., Folkerts, G., Garssen, J., Adcock, I., & Mortaz, E. (2020). Effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes on the induction of mouse tolerogenic dendritic cells. *Journal of Cellular Physiology*, 235(10), 7043–7055. <https://doi.org/10.1002/jcp.29601>.
163. Cho, B. S., Kim, J. O., Ha, D. H., & Yi, Y. W. (2018). Exosomes derived from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells alleviate atopic dermatitis. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(1), 187. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0939-5>.
164. Lambrecht, B. N., &ammad, H. (2015). The immunology of asthma. *Nature Immunology*, 16(1), 45–56. <https://doi.org/10.1038/ni.3049>.
165. Kavanagh, H., & Mahon, B. P. (2011). Allogeneic mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation by inducing murine regulatory T cells. *Allergy*, 66(4), 523–531. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2010.02509.x>.
166. Chen, Q. H., Wu, F., Liu, L., Chen, H. B., Zheng, R. Q., Wang, H. L., & Yu, L. N. (2020). Mesenchymal stem cells regulate the Th17/Treg cell balance partly through hepatocyte growth factor in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01612-y>.
167. Boonpiyathad, T., Sokolowska, M., Morita, H., Rückert, B., Kast, J. I., Wawrzyniak, M., Sangasapaviliya, A., Pradubpongsa, P., Fuengthong, R., Thantivorasit, P., Sirivichayakul, S., Kwok, W. W., Ruxrungtham, K., Akdis, M., & Akdis, C. A. (2019). Derp 1-specific regulatory T-cell response during house dust mite allergen immunotherapy. *Allergy*, 74(5), 976–985. <https://doi.org/10.1111/all.13684>.
168. Rasmusson, I., Ringdén, O., Sundberg, B., & Le Blanc, K. (2005). Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Experimental Cell Research*, 305(1), 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.12.013>.
169. Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., & Ozawa, K. (2007). Nitric oxide plays a critical role in

- suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*, 109(1), 228–234. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-002246>.
170. Su, J., Chen, X., Huang, Y., Li, W., Li, J., Cao, K., Cao, G., Zhang, L., Li, F., Roberts, A. I., Kang, H., Yu, P., Ren, G., Ji, W., Wang, Y., & Shi, Y. (2014). Phylogenetic distinction of iNOS and IDO function in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression in mammalian species. *Cell Death and Differentiation*, 21(3), 388–396. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.149>.
 171. Garcia-Ortiz, A., & Serrador, J. M. (2018). Nitric oxide signaling in T cell-mediated immunity. *Trends in Molecular Medicine*, 24(4), 412–427. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.02.002>.
 172. Ma, O. K., & Chan, K. H. (2016). Immunomodulation by mesenchymal stem cells: Interplay between mesenchymal stem cells and regulatory lymphocytes. *World J Stem Cells*, 8(9), 268–278. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v8.i9.268>.
 173. Robinson, D. S. (2010). The role of the T cell in asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 126(6), 1081–1091; quiz 1092–1083. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.06.025>.
 174. Ghannam, S., Pène, J., Moquet-Torcy, G., Torcy-Moquet, G., Jorgensen, C., & Yssel, H. (2010). Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *Journal of Immunology*, 185(1), 302–312. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902007>.
 175. Cho, K. S., Park, M. K., Kang, S. A., Park, H. Y., Hong, S. L., Park, H. K., Yu, H. S., & Roh, H. J. (2014). Adipose-derived stem cells ameliorate allergic airway inflammation by inducing regulatory T cells in a mouse model of asthma. *Mediators of Inflammation*, 2014, 436476–436412. <https://doi.org/10.1155/2014/436476>.
 176. Park, H. K., Cho, K. S., Park, H. Y., Shin, D. H., Kim, Y. K., Jung, J. S., Park, S. K., & Roh, H. J. (2010). Adipose-derived stromal cells inhibit allergic airway inflammation in mice. *Stem Cells and Development*, 19(11), 1811–1818. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0513>.
 177. Braza, F., Dirou, S., Forest, V., Sauzeau, V., Hassoun, D., Chesné, J., Cheminant-Muller, M. A., Sagan, C., Magnan, A., & Lemarchand, P. (2016). Mesenchymal stem cells induce suppressive macrophages through phagocytosis in a mouse model of asthma. *Stem Cells*, 34(7), 1836–1845. <https://doi.org/10.1002/stem.2344>.
 178. de Castro, L. L., Xisto, D. G., Kitoko, J. Z., Cruz, F. F., Olsen, P. C., Redondo, P. A. G., Ferreira, T. P. T., Weiss, D. J., Martins, M. A., Morales, M. M., & Rocco, P. R. M. (2017). Human adipose tissue mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles act differentially on lung mechanics and inflammation in experimental allergic asthma. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 151. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0600-8>.
 179. Duong, K. M., Arikkatt, J., Ullah, M. A., Lynch, J. P., Zhang, V., Atkinson, K., Sly, P. D., & Phipps, S. (2015). Immunomodulation of airway epithelium cell activation by mesenchymal stromal cells ameliorates house dust mite-induced airway inflammation in mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 53(5), 615–624. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2014-0431OC>.
 180. Dai, R., Liu, J., Cai, S., Zheng, C., & Zhou, X. (2017). Delivery of adipose-derived mesenchymal stem cells attenuates airway responsiveness and inflammation in a mouse model of ovalbumin-induced asthma. *American Journal of Translational Research*, 9(5), 2421–2428.
 181. Hong, G. H., Kwon, H. S., Lee, K. Y., Ha, E. H., Moon, K. A., Kim, S. W., Oh, W., Kim, T. B., Moon, H. B., & Cho, Y. S. (2017). hMSCs suppress neutrophil-dominant airway inflammation in a murine model of asthma. *Experimental & Molecular Medicine*, 49(1), e288. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.135>.
 182. Abreu, S. C., Antunes, M. A., Xisto, D. G., Cruz, F. F., Branco, V. C., Bandeira, E., Zola Kitoko, J., de Araújo, A. F., Dellatorre-Teixeira, L., Olsen, P. C., Weiss, D. J., Diaz, B. L., Morales, M. M., & Rocco, P. R. M. (2017). Bone marrow, adipose, and lung tissue-derived murine Mesenchymal stromal cells release different mediators and differentially affect airway and lung parenchyma in experimental asthma. *Stem Cells Translational Medicine*, 6(6), 1557–1567. <https://doi.org/10.1002/sctm.16-0398>.
 183. Bonfield, T. L., Koloze, M., Lemmon, D. P., Zuchowski, B., Yang, S. E., & Caplan, A. I. (2010). Human mesenchymal stem cells suppress chronic airway inflammation in the murine ovalbumin asthma model. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 299(6), L760–L770. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00182.2009>.
 184. Sugita, K., Steer, C. A., Martinez-Gonzalez, I., Altunbulakli, C., Morita, H., Castro-Giner, F., et al. (2018). Type 2 innate lymphoid cells disrupt bronchial epithelial barrier integrity by targeting tight junctions through IL-13 in asthmatic patients. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(1), 300–310.e311. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.02.038>.
 185. Wawrzyniak, P., Wawrzyniak, M., Wanke, K., Sokolowska, M., Bendelja, K., Rückert, B., Globinska, A., Jakiela, B., Kast, J. I., Idzko, M., Akdis, M., Sanak, M., & Akdis, C. A. (2017). Regulation of bronchial epithelial barrier integrity by type 2 cytokines and histone deacetylases in asthmatic patients. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 139(1), 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.03.050>.
 186. Tan, H. T., Hagner, S., Ruchti, F., Radzikowska, U., Tan, G., Altunbulakli, C., et al. (2018). Tight junction, mucin, and inflammasome-related molecules are differentially expressed in eosinophilic, mixed, and neutrophilic experimental asthma in mice. *Allergy*, 74, 294–307. <https://doi.org/10.1111/all.13619>.
 187. Mathias, L. J., Khong, S. M., Spyroglou, L., Payne, N. L., Siatskas, C., Thorburn, A. N., et al. (2013). Alveolar macrophages are critical for the inhibition of allergic asthma by mesenchymal stromal cells. *Journal of Immunology*, 191(12), 5914–5924. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300667>.
 188. Takeda, K., Webb, T. L., Ning, F., Shiraishi, Y., Regan, D. P., Chow, L., Smith, M. J., Ashino, S., Guth, A. M., Hopkins, S., Gelfand, E. W., & Dow, S. (2018). Mesenchymal stem cells recruit CCR2. *Journal of Immunology*, 200(4), 1261–1269. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700562>.
 189. Ou-Yang, H. F., Huang, Y., Hu, X. B., & Wu, C. G. (2011). Suppression of allergic airway inflammation in a mouse model of asthma by exogenous mesenchymal stem cells. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 236(12), 1461–1467. <https://doi.org/10.1258/ebm.2011.011221>.
 190. Lin, C. L., Hsiao, G., Wang, C. C., & Lee, Y. L. (2016). Imperatorin exerts anti-allergic effects in Th2-mediated allergic asthma via induction of IL-10-producing regulatory T cells by modulating the function of dendritic cells. *Pharmacological Research*, 110, 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.04.030>.
 191. Kitoko, J. Z., de Castro, L. L., Nascimento, A. P., Abreu, S. C., Cruz, F. F., Arantes, A. C., Xisto, D. G., Martins, M. A., Morales, M. M., Rocco, P. R. M., & Olsen, P. C. (2018). Therapeutic administration of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells reduces airway inflammation without up-regulating Tregs in experimental asthma. *Clinical and Experimental Allergy*, 48(2), 205–216. <https://doi.org/10.1111/cea.13048>.
 192. Eiwegger, T., & Akdis, C. A. (2011). IL-33 links tissue cells, dendritic cells and Th2 cell development in a mouse model of asthma. *European Journal of Immunology*, 41(6), 1535–1538. <https://doi.org/10.1002/eji.201141668>.
 193. Hammad, H., & Lambrecht, B. N. (2008). Dendritic cells and epithelial cells: Linking innate and adaptive immunity in asthma.

V) CEL PRACY

Celem pracy było:

- 1) potwierdzenie fenotypu, zdolności do różnicowania się w komórki linii mezodermalnej oraz właściwości immunosupresyjnych ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej usuniętej podczas zabiegu abdominoplastyki;
- 2) ocena bezpieczeństwa stosowania mezenchymalnych komórek macierzystych jako potencjalnej strategii terapeutycznej w astmie z wykorzystaniem modelu mysiego;
- 3) zbadanie i opisanie mechanizmów immunosupresyjnego działania tych komórek w eksperymentalnym modelu astmy indukowanej ekstraktem roztocza kurzu domowego (*ang. house dust mite, HDM*).

VI) MATERIAŁY I METODY

1) Izolacja i hodowla mezenchymalnych komórek macierzystych

Mezenchymalne komórki macierzyste zostały wyizolowane z tkanki tłuszczowej pobranej z fałdów tłuszczowo-skórnych od pacjentów zakwalifikowanych do zabiegu abdominoplastyki w I Klinice Chirurgii Ogólnej i Endokrynologicznej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Białymstoku. Wszyscy pacjenci po zapoznaniu się z celem badań wyrazili zgodę na przekazanie usuniętych podczas zabiegu tkanek do celów naukowych. Na przeprowadzenie poniższych procedur została uzyskana zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (uchwała nr APK.002.114.2021 z dnia 25 lutego 2021 roku).

W pierwszym etapie, tkanka tłuszczowa została mechanicznej fragmentacji w warunkach jałowych. Następnie, w celu degradacji włókienek kolagenowych występujących w tkankach łącznych, do rozdrobnionej tkanki tłuszczowej została dodana kolagenaza IV (Gibco, Life Technologies) w stężeniu 1mg/ml. Tkanka tłuszczowa z kolagenazą IV była inkubowana przez okres 45 minut w optymalnych warunkach hodowlanych (37°C, przy stałym napływie CO₂ na poziomie 5%). Działanie enzymu zostało poddane inaktywacji poprzez dodanie medium hodowlanego (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM; PAN- Biotech) zawierającego 10% bydlęcą surowicę płodową (FBS, PAN-Biotech). Większe fragmenty tkankowe zostały oddzielone od powstałej zawiesiny na filtrze komórkowym (Greiner-bio-one) o średnicy porów równej 100µm, po czym próbkę odwirowano z przyspieszeniem osrodkowym równym 400g przez okres 5 minut. Wyizolowane komórki były hodowane w dedykowanym medium wspierającym ich wzrost i proliferację (*Mesenchymal Stem Cells Basal Medium* (ATCC) *supplemented with Mesenchymal Stem Cell Growth Kit for Adipose, Umbilical, and Bone Marrow-derived MSCs* (ATCC)) z dodatkiem gentamycyny (0,015 mg/ml, Gibco). Fenotyp oraz właściwości mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki

łuszczowej zostały potwierdzone zgodnie z minimalnymi kryteriami przyjętymi przez Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej, a więc ocenie poddano: 1) adhezję komórek do powierzchni plastikowych, 2) ekspresję markerów powierzchniowych CD73, CD90 i CD105, 3) zdolność do różnicowania się do komórek linii mezodermalnej tj. adipocytów, osteocytów i chondrocytów. Każdorazowo po trzecim pasażu MSC pochodzące z ludzkiej tkanki tłuszczowej zostały zamrożone przyżyciowo celem wykorzystania w badaniach *in vivo*.

2) Cytometryczna ocena fenotypu mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z ludzkiej tkanki tłuszczowej

W celu potwierdzenia fenotypu mezenchymalnych komórek macierzystych ocenie została poddana ekspresja markerów CD73, CD90, CD105, CD45, HLA-DR. MSC były inkubowane z przeciwciałami monoklonalnymi sprzężonymi z fluorochromem przez 30 minut w miejscu z ograniczonym dopływem światła. Lista przeciwciał użytych w doświadczeniu została zestawiona w Tabeli 2. Próbkę zostały przeanalizowane przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur (BD Biosciences) oraz programu FlowJo v.10. Strategia bramkowania dla wskazanych analiz została włączona do pracy oryginalnej i zaprezentowana w Materiałach Uzupełniających (*Figure S1*, strona numer 73 niniejszej rozprawy doktorskiej).

Tabela 2. Lista przeciwciał użytych w celu oceny fenotypu MSC.

Przeciwciało	Klon	Gospodarz	Izotyp	Producent	Nr katalogowy
anti-human CD73 FITC	AD2	Mysz	IgG1, κ	BioLegend	344016
anti-human CD90 PE	5E10	Mysz	IgG1, κ	BioLegend	328110
anti-human CD105 APC	43A3	Mysz	IgG1, κ	BioLegend	323208
anti-human CD45 PerCP	2D1	Mysz	IgG1, κ	BioLegend	368506
anti-human HLA-DR APC	TU36	Mysz	IgG2b, κ	BD Pharmingen	559868

APC (*ang. Allophycocyanin*) - allofikocyjanina; CD (*ang. Cluster of Differentiation*)- antygen różnicowania komórkowego; Cy7/Cy5.5 (*ang. cyanine 7/5.5*)- cyjanina 7/ 5.5; FITC (*ang. Fluorescein isothiocyanate*)- Izotiocyanian fluoresceiny; HLA (*ang. human leukocyte antigen DR isotype*)- ludzki antygen zgodności tkanowej izotyp DR IgG- immunoglobulina G; PE (*ang. Phycoerythrin*)- fikoerytryna; PerCP (*ang. Peridinin-Chlorophyll-Protein*)- białko Perydynina-chlorofil; κ- łańcuch lekki kapa.

3) Potwierdzenie zdolności mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z ludzkiej tkanki tłuszczowej do różnicowania się *in vitro* w kierunku komórek linii mezodermalnej

Wyizolowane mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z ludzkiej tkanki tłuszczowej zostały zróżnicowane w kierunku komórek linii mezodermalnej, a mianowicie adipocytów, chondrocytów i osteocytów. Różnicowanie było prowadzone przez maksymalnie 21 dni od momentu dodania dedykowanego medium różnicującego dla poszczególnych komórek linii mezodermalnej. Procedura została przeprowadzona z użyciem zestawu *Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit* (R&D systems) zgodnie z załączonym protokołem. Różnicowanie do adipocytów, chondrocytów i osteocytów zostało potwierdzone poprzez detekcję charakterystycznych markerów dla poszczególnych typów komórek. Lista użytych przeciwciał dla poszczególnych komórek linii mezodermalnej została zestawiona w Tabeli 3. Jądra zostały wybarwione na niebiesko z użyciem DAPI. Zdjęcia zostały wykonane przy pomocy mikroskopu konfokalnego Olympus FV1200 (Olympus).

Tabela 3. Lista przeciwciał użytych w celu detekcji charakterystycznych markerów komórek linii mezodermalnej.

Przeciwciało	Stężenie	Klon	Źródło	Typ komórek
Polyclonal goat anti -mouse FABP4	10 µg/ml	poliklonalne	koza	Adipocyty
Polyclonal goat anti-human Aggrecan	10 µg/ml	poliklonalne	koza	Chondrocyty
Monoclonal mouse anti-human Osteocalcin	10 µg/ml	190125	mysz	Osteocyty

FABP4 (ang. fatty acid binding protein 4)- białko wiążące kwasy tłuszczowe 4

4) Ocena immunosupresyjnych właściwości mezenchymalnych komórek macierzystych w warunkach *in vitro*

- a) Kohodowla MSC wraz proliferującymi jednojądrzastymi komórkami krwi obwodowej (ang. *peripheral blood mononuclear cells, PBMC*) stymulowanymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko CD3/CD28.

MSC zostały wysiane na 24-dołkowe płytki hodowlane (Corning) w różnych ilościach (100 tysięcy, 50 tysięcy, 10 tysięcy komórek na dołek). PBMC zostały wyizolowane z wykorzystaniem gradientu gęstości (Pancoll human, PAN-Biotech) zgodnie ze standardową procedurą. Wybarwione CFSE (ester sukcyνοimidylowy karboksylu fluoresceiny) PBMC (500 tysięcy komórek) zostały dodane do dołków z MSC, a następnie stymulowane przeciwciałami skierowanymi przeciwko CD3/CD28 (R&D systems) w celu indukcji ich proliferacji. Kontrolę do badań stanowiły stymulowane PBMC, inkubowane bez MSC. Eksperyment został przeprowadzony w medium Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI, PAN-Biotech) zawierającym 10% FBS, bez dodatku gentamycyny. Po upływie 96 godzin test proliferacji PBMC przeanalizowano przy pomocy cytometru przepływowego FACSCallibur (BD Biosciences) i programu FlowJo v.10 (BD Biosciences).

b) Ocena właściwości immunosupresyjnych MSC po stymulacji cytokinami prozapalnymi

MSC zostały wysiane na 48-dołkowe płytki hodowlane (Corning) w ilości 25 tysięcy komórek na dołek w dedykowanym medium hodowlanym bez dodatku gentamycyny. Po upływie 24 godzin komórki były stymulowane z użyciem rekombinowanych białek ludzkich (R&D systems), a mianowicie IL-1 β (25 ng/ml), TNF α (50 ng/ml), IFN γ (50 ng/ml). Kontrolę stanowiły komórki niestymulowane. MSC były inkubowane w optymalnych warunkach hodowlanych przez kolejnych pięć dni (120 godzin), w trakcie których materiał zbierano każdorazowo co 24 godziny celem wykonania poniższych analiz. Komórki zostały poddane lizie w buforze lizującym (RLT Lysing Buffer, Qiagen) zawierającym β -merkaptoetanol (Sigma). RNA zostało wyizolowane z użyciem zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen) zgodnie ze standardową procedurą dołączoną przez producenta.

Stężenie oraz jakość RNA w poszczególnych próbkach została oceniona przy pomocy spektrofotometru NanoDrop 2000 (ThermoScientific). Całkowite RNA poddano ilościowej konwersji do cDNA w procesie odwrotnej transkrypcji (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems) z użyciem systemu StepOnePlus Real Time PCR (Applied Biosystems). Ekspresję genów *CD274* (*PD-L1*) oraz *IL-1 β* oceniono w ilościowej reakcji PCR opartej na wykorzystaniu nukleolitycznych sond typu TaqMan i TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems). Ekspresja badanych genów została znormalizowana względem genu referencyjnego *GAPDH*. Lista starterów (TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems) użytych w badaniu została przedstawiona w Tabeli 4. Reakcja PCR została przeprowadzona przy użyciu systemu StepOnePlus Real Time PCR (Applied Biosystems). Wyniki zostały przeanalizowane przy pomocy programu StepOnePlus™ Software v2.3 (Applied Biosystems). Różnice pomiędzy badanymi próbkami oceniono z użyciem testu U Mann Whitney’a w programie GraphPad Prism v.9. Wyniki zostały przedstawione jako $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Tabela 4. Lista starterów użytych w badaniu.

Gen	Producent	Nr katalogowy
<i>PD-L1/ CD274</i>	Applied Biosystems	Hs01125301_m1
<i>IL-10</i>	Applied Biosystems	Hs01125301_m1
<i>GAPDH</i>	Applied Biosystems	Hs00961622_m1

PD-L1 (ang. *programmed death ligand 1*) – receptor/ ligand programowanej śmierci komórkowej 1, *IL-10*-interleukina 10; *GAPDH* (ang. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)- Dehydrogenaza aldehydu 3- fosfoglicerynowego

- c) W supernatantach hodowlanych oceniono poziom przeciwzapalnej IL-10 przy pomocy testu immunoenzymatycznego ELISA (R&D systems), zgodnie ze standardową procedurą dostarczoną przez producenta. Stężenie badanej cytokiny w próbkach odczytano na podstawie krzywej kalibracyjnej (31,2 - 2000 pg/ml) z użyciem czytnika płytek (Ledetect, Labexim Products). Analizę wyników przeprowadzono w programie MicroWin2000 software (OEM version, Labexim

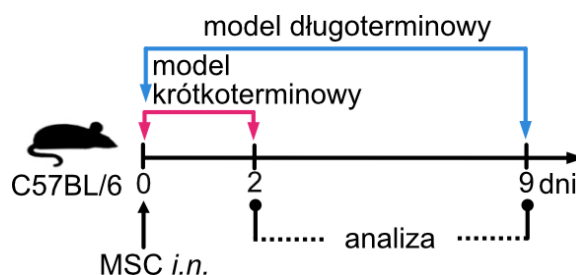
Products). Różnice pomiędzy badanymi próbkami oceniono z użyciem testu U Mann Whitney'a w programie GraphPad Prism v.9.

- d) Ekspresja markera powierzchniowego PD-L1 została oceniona przy pomocy cytometrii przepływowej. Komórki wybarwiono z użyciem przeciwciała monoklonalnego sprzężonego z fluorochromem (anti- human PD-L1 PE, BD Pharmingen). Ekspresja markera na badanych komórkach została przeanalizowana z użyciem cytometru przepływowego FACSCalibur (BD Biosciences).

5) Modele mysie

W niniejszych badaniach wykorzystane zostały myszy płci żeńskiej, szczepu C57BL/6 w wieku od 6- 8 tygodni. Na przeprowadzenie opisanych procedur uzyskana została zgoda Lokalnej Komisji Etycznej ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Olsztynie (uchwała nr 35/2019 z dnia 26 kwietnia 2019 roku).

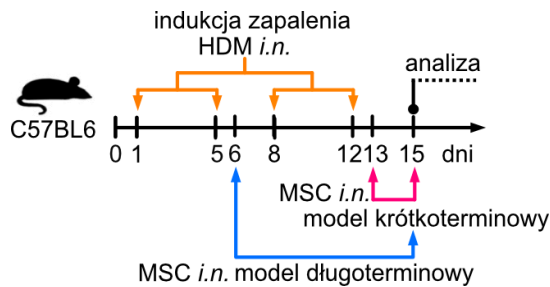
- a) Ocena wpływu przez nosowego podania ludzkich MSC pochodzących z tkanki tłuszczowej na płuca nieobjęte stanem zapalnym w mysim modelu doświadczalnym. Zawiesina mezenchymalnych komórek macierzystych w ilości 500 tysięcy została podana myszom przez nosowo w 20µl jednokrotnie stężonego roztworu buforowanej fosforanem soli fizjologicznej (1X PBS, Corning). W celu oceny krótko- oraz długoterminowych efektów działania MSC, zwierzęta zostały uśmiercone odpowiednio po 2 oraz 9 dniach od momentu podania komórek (Rycina 2). Kontrolę badania stanowiły zwierzęta otrzymujące 0,9% roztwór soli fizjologicznej (NaCl, Fresenius Kabi).



Rycina 2. Graficzne podsumowanie modelu użytego w badaniu (n=5). Myszy szczepu C57BL/6 otrzymywały zawiesinę MSC (500 tysięcy komórek w 1X PBS). Następnie zwierzęta zostały uśmiercone odpowiednio po 2 (model krótkoterminowy) oraz 9 dniach (model długoterminowy) od podania komórek. 1X PBS- jednokrotnie stężony roztwór buforowanej fosforanem soli fizjologicznej; MSC-mezenchymalne komórki macierzyste; i.n. (*ang. intranasally*) - przeznosowo.

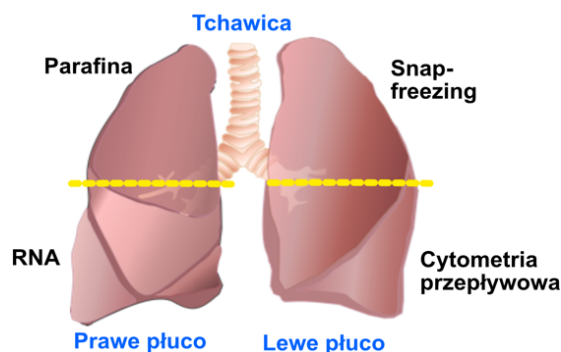
- b) Ocena wpływu przez nosowego podawania ludzkich MSC pochodzących z tkanki tłuszczowej na rozwój zapalenia dróg oddechowych w eksperymentalnym modelu astmy

W celu indukcji zapalenia dolnych dróg oddechowych o fenotypie eozynofilowym oraz neutrofilowym myszom podawano przez nosowo ekstrakt roztocza kurzu domowego HDM (*ang. house dust mite*, Citeq Biologicals) [90], odpowiednio w dawce 10 µg przez okres 5 dni, po których następowały 2 dni przerwy. W kolejnym tygodniu doświadczenia proces indukcji zapalenia został powtórzony. Dodatkowo, myszy otrzymywały przez nosowo 20µl zawiesiny MSC w PBS w dwóch punktach czasowych, celem oceny krótko- oraz długoterminowych efektów ich działania. Wszystkie zwierzęta zostały uśmiercone w 15 dniu eksperymentu. Kontrolę badania stanowiły myszy otrzymujące 0,9% roztwór NaCl (Rycina 3). Eksperymentalny model astmy użyty w niniejszych badaniach jest opracowany na podstawie doświadczeń zrealizowanych w Szwajcarskim Instytucie Badań nad Alergią i Astmą (*ang. Swiss Institute of Allergy and Asthma Research, SIAF*) oraz opublikowanych w czasopiśmie *Allergy* (2018) [91].



Rycina 3. Graficzne podsumowanie eksperymentalnego modelu astmy indukowanej ekstraktem HDM wraz z podaniem MSC w dwóch punktach czasowych, $n=5$. Zapalenie dolnych dróg oddechowych zostało wyindukowane poprzez przesnosowe (i.n.) podanie ekstraktu HDM w dawce $10\mu\text{g}$ przez pięć kolejnych dni w obu tygodniach stymulacji. Zawiesina MSC i.n. została podana w 13 oraz 6 dniu eksperymentu celem oceny krótko- i długoterminowego efektu działania komórek. Wszystkie myszy uśmiercono w 15 dniu doświadczenia.

Po zakończeniu opisanych wyżej eksperymentów od wszystkich zwierząt zostały pobrane popłuczyny-oskrzelowo pęcherzykowe (*ang. bronchoalveolar lavage, BAL*). Roztwór 1X PBS (Corning) wraz z inhibitorami proteaz (cOmplete Protease Inhibitor Cocktail, Roche) wtłoczono do oskrzelowo do płuc, a następnie odciągnięto przy użyciu sterylnej strzykawki zakończonej kaniulą. Próbki BAL zostały zabezpieczone zgodnie z zoptymalizowanymi procedurami, a następnie zamrożone w temperaturze -80°C celem włączenia do kolejnych analiz. Dodatkowo, pobrano płuca, które następnie w celu zachowania powtarzalności wyników zostały podzielone na płyty wg załączonego schematu (Rycina 4). Podsumowanie użytych procedur oraz wykonanych analiz prezentuje Tabela 5.



Rycina 4. Podziału płuca na płyty wraz z przeznaczeniem do prowadzonych analiz.

Tabela 5. Podsumowanie procedur użytych do zabezpieczenia pobranego materiału oraz wykonanych analiz.

Rodzaj pobranego materiału	Procedura zabezpieczenia materiału	Wykonane analizy
Płuca	4% roztwór paraformaldehydu przez 24 godziny, a następnie zatopienie w parafinie	Ocena histopatologiczna płuc (hematoksylina i eozyna, barwienie trójkromowe Masson'a, identyfikacja polisacharydów- kwasem nadjodowym Schiffa, PAS)
		Celowane barwienia immunohistochemiczne oceniające depozycję wybranych typów kolagenów
	Dysocjacja komórkowa z użyciem systemu gentleMACS dissociator (Miltenyi Biotec), bezpośrednie włączenie materiału do analiz	Ocena populacji efektorowych limfocytów T z użyciem cytometrii przepływowej
	Stabilizacja komórkowego RNA w roztworze RNA later (Invitrogen, ThermoFisher) przez 48 godzin	Analiza transkryptomyczna (platforma Illumina)
	Zatopienie w ciekłym azocie (<i>snap-freezing</i>) i zamrożenie w -80°C	Ocena ekspresji wybranych białek bariery epitelialnej przy pomocy mikroskopii konfokalnej
Popłuczyny oskrzelowo-pęcherzykowe (BAL)	Odwirowanie frakcji komórkowej, zamrożenie supernatantu w -80°C	Ocena profilu cytokinowego przy pomocy testów immunoenzymatycznych

BAL (*ang. bronchoalveolar lavage*)- popłuczyny oskrzelowo- pęcherzykowe; PAS (*ang.periodic acid Schiff-stain*)- barwienie kwasem nadjodowym Schiffa; RNA- kwas rybonukleinowy,

6) Barwienia histochemiczne

Zatopione w parafinie płyty płucne zostały ścięte na $5\mu\text{m}$ skrawki, a następnie umieszczone na szkiełku podstawowym i odparafinowane. Przygotowane preparaty zostały włączone do opisanych niżej barwień histopatologicznych.

a) Hematoksylina i eozyna (H&E)

W celu oceny stopnia infiltracji komórek immunologicznych w tkance płucnej wykonane zostało barwienie hematoksyliną i eozyną zgodnie ze standardowym protokołem. Grantowa, zasadowa hematoksylina przyłączyła się do DNA w jądrach

komórkowych, natomiast czerwona, kwasowa eozyna do białek cytoplazmatycznych.

b) Kwas nadjodowy Schiffa (*ang. Periodic acid- Schiff stain, PAS*)

Celem oceny produkcji śluzu w obrębie płuc wykonane zostało barwienie PAS zgodnie ze standardową procedurą. Metoda ta umożliwia wykrycie mukopolisacharydów znajdujących się śluzie, barwiąc go na kolor czerwono-różowy.

Zdjęcia preparatów zostały wykonane przy użyciu cyfrowego skanera Nanozoomer SQ (Hamamatsu).

7) Ocena preparatów histochemicznych

Każdy preparat został przeanalizowany z użyciem programu ImageJ (NIH). Powierzchnię tkanki płucnej mierzono z użyciem narzędzia *threshold*. Suwak w panelu *brightness* został odpowiednio dostosowany, aby pokryć cały obszar tkanki. W celu oceny stopnia nacieku zapalnego (barwienie H&E), analiza została zawężona jedynie do przedziału kolorystycznego obejmującego odcienie fioletu. Wyniki zostały zaprezentowane jako średnia z 3 pomiarów wykonanych dla tego samego preparatu. Powierzchnię analizowanego obszaru (naciek zapalny) znormalizowano względem powierzchni całej tkanki z wykluczeniem wolnych przestrzeni międzykomórkowych. Analogicznie do poprzednich analiz, w celu oceny produkcji śluzu (barwienie PAS) suwak został dostosowany by pokryć barwę różowo-czerwoną. Dodatkowo, zmierzona została również powierzchnia samych oskrzeli/ oskrzelików. W celu maksymalnej optymalizacji wyników w obrębie jednego preparatu oceniono dwa różne oskrzeliki oraz wykonano pomiary trzykrotnie. Dodatkowo, celem uproszczenia obliczeń matematycznych za kształt oskrzelika przyjęto koło. Na podstawie wykonanych pomiarów obliczony został obwód oskrzelika. Wyniki zostały przedstawione jako stosunek obszaru

zajmowanego przez śluz do obwodu oskrzelika. Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem testu U Mann Whitney’a w programie GraphPad Prism v.9.

8) Cytometryczna ocena składu ilościowego i jakościowego populacji limfocytów efektorowych

W celu uzyskania jednorodnej zawiesiny komórkowej, płaty płucne zostały poddane enzymatycznej dysocjacji z użyciem systemu gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Wykorzystanie tego systemu charakteryzuje się wysoką wydajnością pozyskiwania leukocytów z tkanki płucnej, przy jednoczesnym zachowaniu epitopów na powierzchni komórki. Następnie, komórki zostały poddane trzygodzinnej stymulacji z użyciem koktajlu aktywującego (Leukocyte Activation Cocktail with Golgi Plug, BD Biosciences), zawierającego ester PMA (forbol 12-morystynian 13-octanu), jonomycynę oraz Brefeldynę A. Mieszanina ta umożliwia wywołanie odpowiedzi limfocytów T i wewnątrzkomórkową akumulację cytokin. Barwienie zewnątrz- oraz wewnątrzkomórkowe zostało wykonane zgodnie ze standardową procedurą przy użyciu przeciwciał monoklonalnych sprzężonych z fluorochromem. Lista przeciwciał użytych w badaniu została zestawiona w Tabeli 6. Próbkę została przeanalizowana przy pomocy cytometru przepływowego FACS Aria (BD Biosciences) i programu FlowJo v.10. Strategia bramkowania została przedstawiona w pracy oryginalnej wchodzącej do niniejszej rozprawy (*Figure S2*, strona 74). Analizę statystyczną przeprowadzono z użyciem testu U Mann Whitney’a w programie GraphPad Prism v.9.

Tabela 6. Lista przeciwciał użytych w badaniu.

Przeciwciało	Klon	Gospodarz	Izotyp	Producent	Nr katalogowy
anti-mouse CD45 PE	30-F11	Szczur	IgG2b, κ	Biolegend	103106
anti-mouse CD3ε	145-2C11	Chomik	IgG	Biolegend	100320
anti-mouse CD4 PE/Dazzle 594	RM4-5	Szczur	IgG2a, κ	Biolegend	100566
anti-mouse IFNγ PerCP-Cy5.5	XMG1.2	Szczur	IgG1, κ	eBioscience	45-7311-80
anti-mouse IL-4 APC	11B11	Szczur	IgG1, κ	eBioscience	17-7041-82
anti-mouse IL-17A Alexa Fluor 488	eBio17B7	Szczur	IgG2a, κ	eBioscience	53-7177-81
anti-mouse IL-10 APC/Cy7	JES5-16E3	Szczur	IgG2b, κ	Biolegend	505036

APC (*ang. Allophycocyanin*) - alofikocyjanina; CD (*ang. Cluster of Differentiation*)- antygen różnicowania komórkowego; Cy7/Cy5.5 (*ang. cyanine 7/5.5*)- cyjanina 7/ 5.5; FITC (*ang. Fluorescein isothiocyanate*)- Izotiocyanian fluoresceiny; IgG-immunoglobulina G; PE (*ang. Phycoerythrin*)- fikoerytryna ; PerCP (*ang. Peridinin-Chlorophyll-Protein*)- białko Perydynina-chlorofil; κ- łańcuch lekki kappa.

9) Ocena ekspresji białek bariery epitelialnej metodą mikroskopii konfokalnej

Płaty płucne zostały zabezpieczone w procesie szybkiego schładzania (*ang. snap freezing*). Tkanekę ścięto na skrawki o grubości 8µm z użyciem kriostatu (Leica CM3050 S) w temperaturze -20°C. Preparaty zostały utrwalone w 4% roztworze paraformaldehydu, a następnie blokowane przez godzinę w roztworze zawierającym 10% surowicę kozią (Dako), 1% albuminę bydlęcą (Sigma Aldrich) oraz 0,2% TritonX100 (Sigma Aldrich). Skrawki tkanki płucnej zostały poddane całonocnej inkubacji z przeciwciałami pierwszorzędowymi: anti-Okludyna (Invitrogen), anti-ZO-1 (Invitrogen) oraz anti-Klaudyna 3, a następnie przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z fluorochromem Alexa488 (Invitrogen). Lista przeciwciał pierwszorzędowych i drugorzędowych użytych w badaniu została zestawiona w Tabeli 7. Zdjęcia wykonano przy pomocy mikroskopu konfokalnego Zeiss LSM780 (Zeiss).

Tabela 7. Lista przeciwciał użytych w badaniu.

Przeciwciało	Stężenie	Klon	Gospodarz	Izotyp	Producent	Nr katalogowy
polyclonal rabbit anti- ZO-1	1:200	poliklonalne	Królik	IgG	Invitrogen	40-2200
monoclonal mouse anti-Occludin	1:200	OC-3F10	Mysz	IgG1, κ	Invitrogen	33-1500
polyclonal rabbit anti-Claudin 3	1:100	poliklonalne	Królik	IgG	Invitrogen	34-1700
goat anti-mouse IgG (H+L) secondary Alexa Fluor 488	1:1000	-	Koza	IgG	Invitrogen	A-11001
goat anti-rabbit IgG (H+L) secondary Alexa Fluor 488	1:1000	-	Koza	IgG	Invitrogen	A-11008

H (*ang. heavy chains*) - łańcuchy ciężkie; L (*ang. light chains*)- łańcuchy lekkie; IgG- immunoglobulina G; κ- łańcuch kappa; ZO- 1 (*ang. zonula occludens 1*)

10) Izolacja RNA i sekwencjonowanie nowej generacji (*ang. next generation sequencing, NGS*)

Odpowiednie płaty płucne były przechowywane w RNA later (Invitrogen, ThermoFisher) w celu stabilizacji i ochrony komórkowego RNA. Tkanica płucna została mechanicznie rozdrobniona w buforze lizującym (RLT Lysing Buffer, Qiagen) zawierającym β- merkaptoetanol (Sigma) z użyciem ręcznego homogenizatora TissueRuptor II (Qiagen). Całkowite RNA zostało wyizolowane z użyciem zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen) zgodnie ze standardową procedurą dostarczoną przez producenta. Do utworzenia bibliotek cDNA

zgodnie z protokołem TruSeq Stranded Total RNA (Illumina) wykorzystano 1µg RNA o wskaźniku integralności (*ang. RNA integrity number, RIN*) większym niż 8. Jakość utworzonych bibliotek została potwierdzona z użyciem narzędzia TapeStation 2200 (Agilent). Sekwencjonowanie nowej generacji (RNAseq) przeprowadzono przy użyciu platformy Illumina HiSeq 4000 generującej 150 par zasad (pz)- odczytów sparowanych końców (2 x 75 pz).

11) Analiza transkryptomyczna

Analiza zróżnicowanej ekspresji genów została przeprowadzona z wykorzystaniem narzędzia DESeq2 z uwzględnieniem kontroli jakości (metod PCA, korelacji, odległości euklidesowej i klastrowania). W celu wyodrębnienia jedynie istotnie statystycznie zróżnicowanych genów przyjęte zostały filtry: $|\text{Log}_2\text{FoldChange}| > 0.5$ oraz skorygowanego $p < 0.1$ (*adjusted p-value*) z uwagi na obecność wielokrotnego testowania. Analiza funkcjonalna szlaków genowych została przeprowadzona z użyciem bazy Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEEG), oprogramowania Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen) lub Metacore (Thomson Reuters). Dodatkowo, analizę terminów procesów biologicznych i molekularnych wykonano z wykorzystaniem bazy bioinformatycznej Gene Ontology (GO). Dane, w tym macierze zliczeń poddane normalizacji oraz zróżnicowane geny, zostały przedstawione graficznie z wykorzystaniem *heatmap* i/ lub *volcano plot*.

12) Ocena ilościowa mediatorów stanu zapalnego w popłuczynach oskrzelowo-pęcherzykowych

Popłuczyny oskrzelowo- pęcherzykowe (*ang. bronchialveolar lavage, BAL*) zostały odwirowane z przyspieszeniem ośrodkowym równym 400g przez okres 5 minut w temperaturze 4°C w celu usunięcia frakcji komórkowej, a następnie zamrożone w -80°C. Poziom analitów białkowych został oznaczony przy użyciu zestawu Luminex Discovery Assay (R&D systems). Metoda ta umożliwiła multipleksową oceną wielu białek w jednej próbce przy

zachowaniu specyficzności testu. Lista analitów wraz z zakresem ich detekcji oraz poziomem czułości została przedstawiona w Tabeli 8. Procedura została przeprowadzona zgodnie ze standardowym protokołem dostarczonym przez producenta (R&D systems). Metoda ta wykorzystuje kulki magnetyczne pokryte przeciwciałem specyficznym dla badanego analitu. Następnie, dane anality były wykrywane przy pomocy koktajlu biotynylowanych przeciwciał i koniugatu streptawidyna-fikoerytryna. Próbkki zostały przanalizowane z użyciem aparatu Luminex 200 (Luminex). Różnice między badanymi grupami zostały ocenione nieparametrycznym testem U Mann Whitney’a przy pomocy programu GraphPad Prism v.9.

Tabela 8. Lista analitów analizowanych w BAL metodą Luminex wraz z zakresem detekcji i czułością.

Analit	Zakres krzywej standardowej[pg/ml]	Czułość [pg/ml]
IL-2	9,05- 2200	0,481
IL-4	64,6- 16000	53,0
IL-5	5,14- 1250	0,237
IL-13	61,7- 15000	6,46
IL-33	82,3- 20000	57,1
IL-17/ IL-17A	49,4- 12000	7,08
IL-17E/ IL-25	147- 36000	8,88
IL-10	12,8-3 100	8,20

IL- interleukina; ml- mililitr; pg- pikogram

V) WYNIKI

1) Podsumowanie opublikowanych wyników wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Opisane poniżej wyniki dotyczy załączonej pracy opublikowanej w czasopiśmie *Frontiers in Immunology* stanowiącej integralną część niniejszej rozprawy. Aby nie powielać informacji zawartej w pracy oryginalnej przedstawiam krótkie podsumowanie uzyskanych wyników bez ich prezentacji graficznej odwołując się do rycin w publikacji.

W pierwszej fazie badań oceniłam fenotyp oraz zdolności do różnicowania się oraz pozyskiwanych z ludzkiej tkanki tłuszczowej MSC (*Supplementary Figure S1A, B; strona 73 niniejszej rozprawy doktorskiej*). Wskazane analizy potwierdziły, iż izolowane komórki:

- a) charakteryzują się ekspresją charakterystycznych markerów, a mianowicie CD73, CD90, CD105, przy jednoczesnym braku ekspresji CD45, HLA-DR;
- b) wykazują adhezję do powierzchni plastikowych;
- c) różnicują się w kierunku komórek linii mezodermalnej tzn. adipocytów, osteocytów oraz chondrocytów.

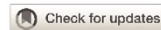
Potwierdzenie charakterystycznego fenotypu i multipotencjalności wyizolowanych MSC pozwoliło na włączenie ich do dalszych etapów badań obejmujących ocenę wpływu ich podania na niezmienną zapalnie tkankę płucną w mysim modelu doświadczalnym oraz późniejsze badania ich wpływu na tkankę objętą procesem zapalnym.

W pierwszym etapie badań *in vivo* oceniłam krótkoterminowe oraz długoterminowe efekty działania przez nosowego podania MSC myszom z niezmienną zapalenie tkanką płucną celem oceny bezpieczeństwa ich stosowania. Badania histologiczne potwierdziły, iż MSC nie indukowały nacieku zapalnego w obrębie tkanki płucnej oraz nie powodowały zwiększonej produkcji śluzu w porównaniu do grupy kontrolnej otrzymującej roztwór soli fizjologicznej (*Figure 1B; strona 58 niniejszej rozprawy doktorskiej*). Jednakże,

zaobserwowałam zwiększony odsetek limfocytów T efektorowych (CD3+CD4+) produkujących IFN γ jako długoterminowy efekt działania MSC, podczas gdy liczebność pozostałych subpopulacji komórkowych produkujących IL-4, IL-17 lub IL-10 nie uległa zmianom, sugerując indukcję zapalenia o niskim stopniu nasilenia (*Figure 1C; strona 58 niniejszej rozprawy doktorskiej*). Dodatkowo, oceniłam ekspresję białek ścisłych połączeń komórkowych (*ang. tight junctions, TJs*), które są odpowiedzialne za utrzymanie integralności bariery nabłonka dróg oddechowych. Zaobserwowałam obniżenie ekspresji okludyny i kładyny 3 zarówno w modelu krótkoterminowym (3 dniowym) jak również długoterminowym (9 dniowym), podczas gdy ekspresja ZO-1 nie uległa zmianie (*Figure 1D; strona 58 niniejszej rozprawy doktorskiej*). Zaobserwowane obniżenie integralności bariery epitelialnej oraz zwiększona ilość komórek produkujących IFN γ może wskazywać na powstanie zapalenia o niskim nasileniu w obrębie dolnych dróg oddechowych [92]. Obniżenie ekspresji białek utrzymujących integralność bariery epitelialnej może być rezultatem aktywności IFN γ [93].

Aby lepiej zrozumieć efekty przez nosowego podania MSC w środowisko dolnych dróg oddechowych, w kolejnym etapie oceniłam zmiany w profilu transkryptomycznym płuc po podaniu MSC (*Figure 1E, F; strona 58 niniejszej rozprawy doktorskiej*). Analiza regulacji szlaków sygnałowych oraz procesów biologicznych z wykorzystaniem oprogramowania IPA oraz klastrów powiązanych genów wykazała, iż znaczna część genów o istotnie statystycznie różnicowanej ekspresji jest powiązana z procesami stresu oksydacyjnego, aktywacji makrofagów i receptorów rozpoznających wzorce oraz fagocytozy. Ponadto, zaobserwowano, iż poziom ekspresji tych genów ulega obniżeniu w modelu długoterminowym w porównaniu do krótkoterminowego (*Figure 2, 3; strona 60-61 niniejszej rozprawy doktorskiej*). Bazując na wynikach badań własnych oraz dotychczasowych publikacjach opisujących efekty działania MSC w różnych modelach doświadczalnych stwierdziłam, że uzyskane wyniki

wspierają hipotezę „*umierającej komórki macierzystej (ang. dying stem cell)*” zaproponowaną przez *Thum T.* [94]. Zgodnie z nią MSC ulegają w środowisku zapalnym apoptozie, a następnie są usuwane przez makrofagi M1 aktywowane przez limfocyty T subpopulacji Th1 produkujące IFN γ , prowadząc do przywrócenia warunków homeostazy [95]. Moje badania wydają się potwierdzać tę hipotezę i pozwalają dodatkowo na jej rozszerzenie. Zgodnie z zaprezentowanymi wynikami proces ten wydaje się nie być ograniczony do tkanek zapalnych, a może również zachodzić w niezmiennych zapalnie płucach. Zgodnie z powyższym, przez nosowe podanie preparatu MSC może być rozpatrywane jako bezpieczne.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Qunzhou Zhang,
University of Pennsylvania,
United States

REVIEWED BY
Mariusz Z. Ratajczak,
University of Louisville Physicians,
United States
Liang Yang,
Nankai University, China

*CORRESPONDENCE
Andrzej Eljaszewicz
andrzej.eljaszewicz@umb.edu.pl
Marcin Moniuszko
marcin.moniuszko@umb.edu.pl

[†]These authors share senior authorship

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Immunological Tolerance
and Regulation,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 12 June 2022
ACCEPTED 25 August 2022
PUBLISHED 16 September 2022

CITATION
Tynecka M, Janucik A, Niemira M,
Zbikowski A, Stocker N, Tarasik A,
Starosz A, Grubczak K, Szalkowska A,
Korotko U, Reszec J, Kwasniewski M,
Kretowski A, Akdis C, Sokolowska M,
Moniuszko M and Eljaszewicz A (2022)
The short-term and long-term
effects of intranasal mesenchymal
stem cell administration to
noninflamed mice lung.
Front. Immunol. 13:967487.
doi: 10.3389/fimmu.2022.967487

COPYRIGHT
© 2022 Tynecka, Janucik, Niemira,
Zbikowski, Stocker, Tarasik, Starosz,
Grubczak, Szalkowska, Korotko, Reszec,
Kwasniewski, Kretowski, Akdis,
Sokolowska, Moniuszko and Eljaszewicz.
This is an open-access article
distributed under the terms of the
Creative Commons Attribution License
(CC BY). The use, distribution or
reproduction in other forums is
permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s)
are credited and that the original
publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic
practice. No use, distribution or
reproduction is permitted which does
not comply with these terms.

The short-term and long-term effects of intranasal mesenchymal stem cell administration to noninflamed mice lung

Marlena Tynecka¹, Adrian Janucik¹, Magdalena Niemira², Arkadiusz Zbikowski³, Nino Stocker⁴, Agnieszka Tarasik⁵, Aleksandra Starosz¹, Kamil Grubczak¹, Anna Szalkowska², Urszula Korotko⁶, Joanna Reszec⁵, Mirosław Kwasniewski⁶, Adam Kretowski^{2,7}, Cezmi Akdis⁴, Milena Sokolowska⁴, Marcin Moniuszko^{1,8*†} and Andrzej Eljaszewicz^{1*†}

¹Department of Regenerative Medicine and Immune Regulation, Medical University of Białystok, Białystok, Poland, ²Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, Białystok, Poland, ³Department of Medical Biology, Medical University of Białystok, Białystok, Poland, ⁴Swiss Institute of Allergy and Asthma Research, University of Zurich, Davos, Switzerland, ⁵Department of Medical Pathomorphology, Medical University of Białystok, Białystok, Poland, ⁶Centre for Bioinformatics and Data Analysis, Medical University of Białystok, Białystok, Poland, ⁷Department of Endocrinology, Diabetology and Internal Medicine, Medical University of Białystok, Białystok, Poland, ⁸Department of Allergology and Internal Medicine, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

Mesenchymal stem cells (mesenchymal stromal cells; MSC)-based therapies remain a promising approach to treat degenerative and inflammatory diseases. Their beneficial effects were confirmed in numerous experimental models and clinical trials. However, safety issues concerning MSCs' stability and their long-term effects limit their implementation in clinical practice, including treatment of respiratory diseases such as asthma, chronic obstructive pulmonary disease, and COVID-19. Here, we aimed to investigate the safety of intranasal application of human adipose tissue-derived MSCs in a preclinical experimental mice model and elucidate their effects on the lungs. We assessed short-term (two days) and long-term (nine days) effects of MSCs administration on lung morphology, immune responses, epithelial barrier function, and transcriptomic profiles. We observed an increased frequency of IFN γ -producing T cells and a decrease in occludin and claudin 3 as a long-term effect of MSCs administration. We also found changes in the lung transcriptomic profiles, reflecting redox imbalance and hypoxia signaling pathway. Additionally, we found dysregulation in genes clustered in pattern recognition receptors, macrophage activation, oxidative stress, and

phagocytosis. Our results suggest that *i.n.* MSCs administration to noninflamed healthy lungs induces, in the late stages, low-grade inflammatory responses aiming at the clearance of MSCs graft.

KEYWORDS

mesenchymal stem cell, noninflamed lung, stem cell-based therapy, epithelial barrier, transcriptomic profiles

Introduction

Since the 90s mesenchymal stem cells (also known as mesenchymal stromal cells, MSCs) have gained considerable interest in the scientific community due to their immunomodulatory properties and regenerative potential. To date, the MSC-mediated beneficial effect has been confirmed in numerous preclinical models, medical experiments, and clinical trials (1–5). In fact, the perspective of MSC-based therapy implementation holds a promise for, to date, incurable or poorly controlled chronic inflammatory and degenerative diseases. According to clinicaltrials.gov, MSCs have been tested in multiple respiratory system diseases, such as acute respiratory distress syndrome, COVID-19, chronic obstructive pulmonary disease, idiopathic pulmonary fibrosis, and asthma.

MSCs are adult multipotent stem cells, initially identified and isolated from the bone marrow (6, 7). Currently, they are replaced by counterparts derived from more accessible sources, such as adipose tissue, Wharton's jelly, and cord blood (2, 5, 8–12).

Notably, differentially sourced MSCs may slightly differ in functional properties and phenotype. Therefore, minimal criteria for their definition have been proposed, namely: i) plastic adherence; ii) surface expression of CD29, CD71, CD73, CD90, CD105, CD271, and simultaneous lack of CD14, CD34, CD45, and HLA-DR; iii) ability to differentiate into at least osteoblasts, adipocytes, and chondrocytes *in vitro* (1). Accumulating evidence shows that their immunoregulatory properties need to be activated by the pro-inflammatory microenvironment. Thus, MSC's anti-inflammatory potential depends on the local milieu. MSCs have been shown to exert immunoregulatory function by i) reduction of monocyte and CD34⁺ cell maturation towards classically activated pro-inflammatory M1 macrophages and dendritic cells (DCs); ii) reduction of adaptive immune responses; iii) recruitment of regulatory T cells (Treg) and induction of effector T cell plasticity towards anti-inflammatory properties; and iv) reduction of cytotoxic innate lymphoid cell activity (1, 8, 13). Unfortunately, MSCs fate in non-inflamed tissue remains elusive.

To date, safety issues concerning the long-term effects of MSCs administration and their stability are raised, limiting their usage in the clinical practice (1, 2, 14). To better understand the effects of MSCs administration on the airway microenvironment, here we

aimed to investigate the longitudinal changes in the lung morphology, epithelial barrier function, immune responses, and transcriptomic profiles of the normal non-inflamed lung in the mouse model. In our model, we used MSCs derived from adipose tissue, representing an attractive and highly available source of these cells.

Materials and methods

Experimental mouse model

Female 6-8-week-old C57BL/6 mice were divided into three groups (n=5 per group). Mice were sacrificed after 2 (short-term) and 9 (long-term) days after intranasal (*i.n.*) administration of the adipose-tissue-derived MSCs (Figure 1A; for detailed method description please see [Supplementary Materials – methods](#)). Biological material was collected and biobanked for further analyses.

Histochemical staining's

The presence of inflammatory infiltration and mucus production in the lung was assessed by histochemical stainings. First, lungs were fixed in 4% paraformaldehyde and paraffin-embedded. Next, 4µm microtome sections were placed on the glass slides (ThermoFisher Scientific) and stained with hematoxylin-eosin (H+E) and Periodic acid-Schiff (PAS) according to the standard protocols. The slides were visualized using a digital slide scanner Nanozoomer SQ (Hamamatsu). Both H+E and PAS staining's were quantified in ImageJ software.

Quantification of hematoxylin-eosin (H+E) and periodic acid-shiff (PAS) staining

Inflammatory infiltration within the lung tissue was quantified using ImageJ software (NIH) in H+E-stained slides. The default thresholding method and the HSB model for color

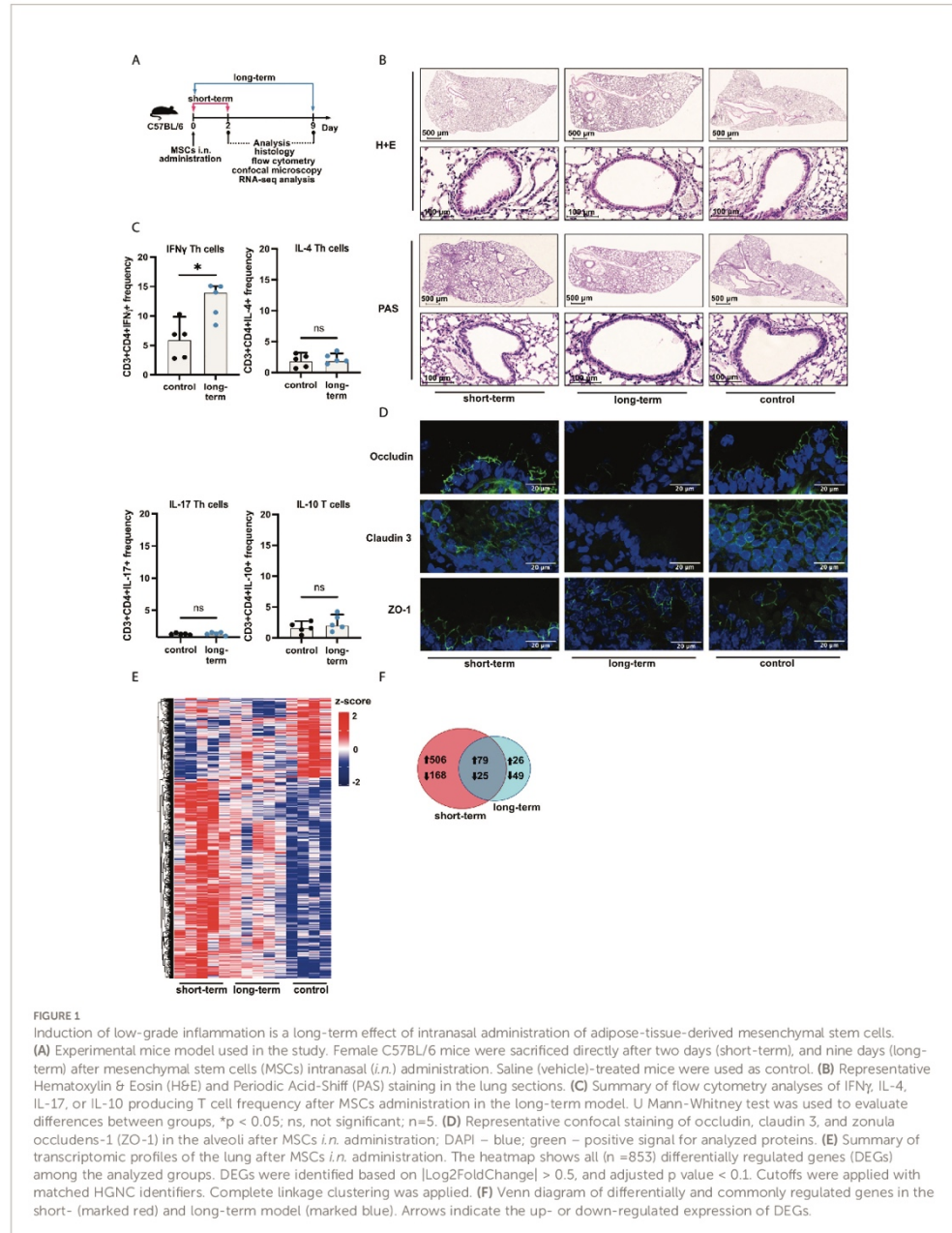


FIGURE 1
 Induction of low-grade inflammation is a long-term effect of intranasal administration of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells. **(A)** Experimental mice model used in the study. Female C57BL/6 mice were sacrificed directly after two days (short-term), and nine days (long-term) after mesenchymal stem cells (MSCs) intranasal (*i.n.*) administration. Saline (vehicle)-treated mice were used as control. **(B)** Representative Hematoxylin & Eosin (H&E) and Periodic Acid-Schiff (PAS) staining in the lung sections. **(C)** Summary of flow cytometry analyses of IFN γ , IL-4, IL-17, or IL-10 producing T cell frequency after MSCs administration in the long-term model. U Mann-Whitney test was used to evaluate differences between groups, * $p < 0.05$; ns, not significant; $n=5$. **(D)** Representative confocal staining of occludin, claudin 3, and zonula occludens-1 (ZO-1) in the alveoli after MSCs *i.n.* administration; DAPI – blue; green – positive signal for analyzed proteins. **(E)** Summary of transcriptomic profiles of the lung after MSCs *i.n.* administration. The heatmap shows all ($n = 853$) differentially regulated genes (DEGs) among the analyzed groups. DEGs were identified based on $|\text{Log}_2\text{FoldChange}| > 0.5$, and adjusted p value < 0.1 . Cutoffs were applied with matched HGNC identifiers. Complete linkage clustering was applied. **(F)** Venn diagram of differentially and commonly regulated genes in the short- (marked red) and long-term model (marked blue). Arrows indicate the up- or down-regulated expression of DEGs.

space were selected to perform the analysis. The lung tissue surface was measured using a threshold tool. The slider in the brightness panel was appropriately adjusted to cover all tissue areas. Additionally, to evaluate the inflammation surface the slider in the hue panel was acquired to imply the dark pink-purple colors. Three independent measurements were performed and the mean was calculated. The results were presented as inflammation area to tissue (slide) area ratio. Additionally, all the values were normalized to the mean of control group measurements. To evaluate the mucus production in PAS-stained slides, the quantification was restricted only to bronchi. To maximize the relevance of the results two different bronchioles within one tissue slide were taken into consideration. Similarly, to assess the mucus area, the slider was adjusted to incorporate pink-red colors. Additionally, the surface inside all bronchi was measured. To simplify the calculations, the bronchi shape was assumed as a circle and the perimeter was calculated. Three measurements for all bronchioles were performed and the mean was calculated. The results were presented as a ratio of mucus area and bronchioles perimeter score.

Flow cytometry

Lung tissue dissociation was performed using Lung Dissociation Kit (Miltenyi Biotec). Next, cells were stimulated with Leukocyte Activation Cocktail with Golgi Plug (BD Pharmingen) for 3 hours. Extracellular and intracellular staining was performed according to the standard protocol using a panel of fluorochrome-labeled monoclonal antibodies (Supplementary Materials – Supplementary Table S2). Cells were acquired using the FACSaria system (BD Biosciences) and analyzed with the FlowJo v.10 software (BD Biosciences). A representative gating strategy has been presented in the Supplementary Materials – Supplementary Figure S2A.

Immunofluorescence staining

Snap-frozen lung tissues were cryosectioned (Leica CM3050 S) at 8 μ m, and subsequently fixed with 4% paraformaldehyde. Cryosections were submerged in blocking solution (10% goat serum, 1% bovine serum albumin, and 0.2% TritonX100) prior to incubation with polyclonal rabbit anti-ZO-1 antibody (Invitrogen), monoclonal mouse anti-occludin (Invitrogen) at 1:200, and polyclonal rabbit anti-claudin 3 (Invitrogen) at 1:100 in 1% BSA in PBS, followed by incubation with Alexa Fluor 488 Goat anti-Rabbit IgG (Invitrogen) or Goat anti-Mouse IgG (Invitrogen) at 1:1000. Specimens were analyzed using a Zeiss LSM780 microscope (Zeiss). The detailed information on used antibodies has been presented in the Supplementary Materials – Supplementary Table S2.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism v.9. Statistical significance was evaluated by the U Mann-Whitney test; $p < 0.05$ was considered significant.

RNA isolation and next-generation sequencing (NGS)

Lung lobes were stored in RNA later solution (Invitrogen) for 48 hours to stabilize RNA. Next, tissues were disrupted using TissueRuptor II (Qiagen) in RNeasy Lysis Buffer (Qiagen). Total RNA was isolated by using the RNeasy Mini Kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen). 1 μ g of total RNA with RNA integrity number (RIN) > 8 , was subjected to the cDNA library preparation according to TruSeq Stranded Total RNA protocol (Illumina), followed by the quality confirmation by TapeStation 2200 (Agilent, CA, USA). Next-generation sequencing (RNAseq) was performed using the Illumina HiSeq 4000 platform generating 150 bp paired-end reads (2 x 75 bp). Subsequently, transcriptomic profiling and analysis were performed. The entire data set has been submitted to the NCBI GEO database: accession number GSE200028 (The datasets are currently private and available under access token: "ovivksgmxdgzhcz", and will be released immediately after manuscript acceptance).

Transcriptome profiling and analysis

Sequencing quality was evaluated by FastQC version 0.11.5. Reads were mapped to the reference genome of *Mus musculus* (GRCm38) using STAR aligner version 2.5.3a. The obtained read counts were used to differential expression analysis (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>; <https://qubeshub.org/resources/fastqc>) (15). Differential gene expression analysis was performed using DESeq2 (16). To adjust the Wald test p-value, the procedure of Benjamini & Hochberg was applied. Additionally, the count matrix was transformed into Transcripts Per Million (TPM) to normalize gene expression. Differentially expressed genes (DEGs) with matched HGNC symbols were identified based on adjusted p-values < 0.1 , and absolute Log2FoldChange > 0.5 . To visualize the expression of DEGs, Venn Diagram, Volcano Plots, and heatmap with complete linkage clustering was generated in "R". Gene Set Enrichment Analysis was performed to reveal Gene Ontology terms present in the dataset. Subsequently, the top 20 terms according to the Benjamini & Hochberg adjusted $p < 0.05$ were plotted on the graphs. Moreover, based on The Mouse Genome Database (MGD; <http://www.informatics.jax.org>; access date: 29th June 2022), individual branches of Gene Ontology terms were selected for further analysis. Commonly

regulated genes were analyzed using string, db and Ingenuity Pathway Analysis (IPA, QIAGEN Inc., <https://digitalinsights.qiagen.com/IPA>). The STRING gene networks were generated concerning all commonly regulated genes, including the predicted and RIKEN genes (n=104). Nodes without any connections were excluded from the network on set medium confidence levels. Using IPA generated pathways with altered z-score, commonly regulated genes for two investigated models were analyzed individually. A two-tailed Mann U Whitney test was applied to assess the difference in the expression of mentioned genes. The delta of the expression was presented using the R package ggplot2 (<https://ggplot2.tidyverse.org>). The expression datasets were analyzed in IPA with the cutoff points for absolute Log2FoldChange > 0.5 and adjusted p-value < 0.1 with additional lung tissue filters applied.

Results

Administration of the adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induces low-grade inflammation and reduces epithelial barrier integrity

First, we aimed to confirm that adipose tissue-derived cells fulfill the criteria of mesenchymal stem cells established by the International Society for Cellular Therapy. We expanded plastic adherent cells and confirmed the surface expression of MSCs characteristic markers, namely CD73, CD90, and CD105, with simultaneous lack of lineage marker CD45 and human leukocyte antigen (HLA-DR) expression (Supplementary Figure S1A). Moreover, we successfully differentiated the cells *in vitro* into adipocytes, osteocytes, and chondrocytes (Supplementary Figure S1B).

Having confirmed that cells isolated from adipose tissue fulfill the criteria of MSCs, next, we wished to investigate the effects of their *i.n.* administration on the induction of inflammation in the lower airways (Figure 1A). We found no signs of increased cellular infiltration and mucus production within the lungs both directly (two days, short-term) and extendedly (nine days, long-term) after MSCs transfer (Figure 1B, Supplementary Materials - Figure S2A). However, we observed an increase in the frequency of INF γ producing, but not IL-4, IL-17, and IL-10 producing, CD3⁺CD4⁺ T cells in the lungs as an effect of the long-term MSCs administration (Figure 1C; Supplementary Materials - Figure S2B). Moreover, occludin and claudin 3, but not ZO-1 were decreased in the long-term model (Figure 1D). To better understand the effects of MSCs administration on the non-inflamed lungs, we next aimed to investigate MSC-mediated effects on the transcriptomic profiles of the lungs. We observed dynamic changes in the lung gene expression profiles after MSCs administration (Figure 1E). We found 674 differentially regulated genes

unique for the short-term model, while only 75 genes were unique for the prolonged observations (Figure 1F), suggesting waning of the low-grade inflammation and active resolution in the longer time point. In addition, a total of 104 genes were common for both analyzed time points.

Gene set enrichment analysis indicated changes in the activation of innate and adaptive immune responses after MSCs administration

Having found significant changes in the transcriptomic profiles, we next wished to elucidate whether differentially regulated genes may be functionally related, integrated, and referred to the specific genes clusters and interaction nodes. Thus, we evaluated the enrichment of DEGs in the gene ontologies, signaling pathways, and mapped predicted interactions using clusterProfiler v.4.0.0 (17). In the top 20 most significant gene ontology terms we found changes in immunological pathways. The normalized enrichment score (NES) analysis indicated activation of the innate and adaptive immune responses. We found upregulation in phagocytosis and engulfment processes and B cell receptor signaling in both analyzed time-points (Figure 2). Moreover, we found an increase in the ribosome function, and biogenesis in MSC-treated mice, longitudinally (Figure 2). More precisely, the analysis of canonical pathways activation revealed the increase in IL-7 signaling, T and B cell signaling in the short- and long-term models compared to controls. Moreover, we found changes reflecting redox imbalance, such as an increase in HIF1 α signaling and superoxide radicals degradation in the short-term model (Figure 3A). In addition to this observation, we noted the gradual downregulation in HIF1 α signaling, IL-17 signaling, and B cell receptor signaling in the longer time point (Figure 3A). Furthermore, the analysis of the expression of genes clustered to the terms and processes related to airway inflammation, namely Th1-, Th2-, Th17-driven immune responses development, tight junction molecules, and mucins, revealed a relatively low number of significantly changed genes (Figure 3B), which stay in line with our *ex vivo* observations of effector T cells, epithelial barrier integrity, and histochemical staining.

Pattern recognition receptors, macrophage activation, oxidative stress, and phagocytosis related genes are differentially expressed in the lungs after MSCs administration

Next, we analyzed deeper the expression profiles of genes related to oxidative stress and immune responses, macrophage activation and phagocytosis. We noted the dysregulated expression of pattern recognition receptors (PRRs, Figure 4A), macrophage activation (Figure 4B), oxidative stress (Figure 4C), phagocytosis (Figure 4D), and inflammation of the respiratory

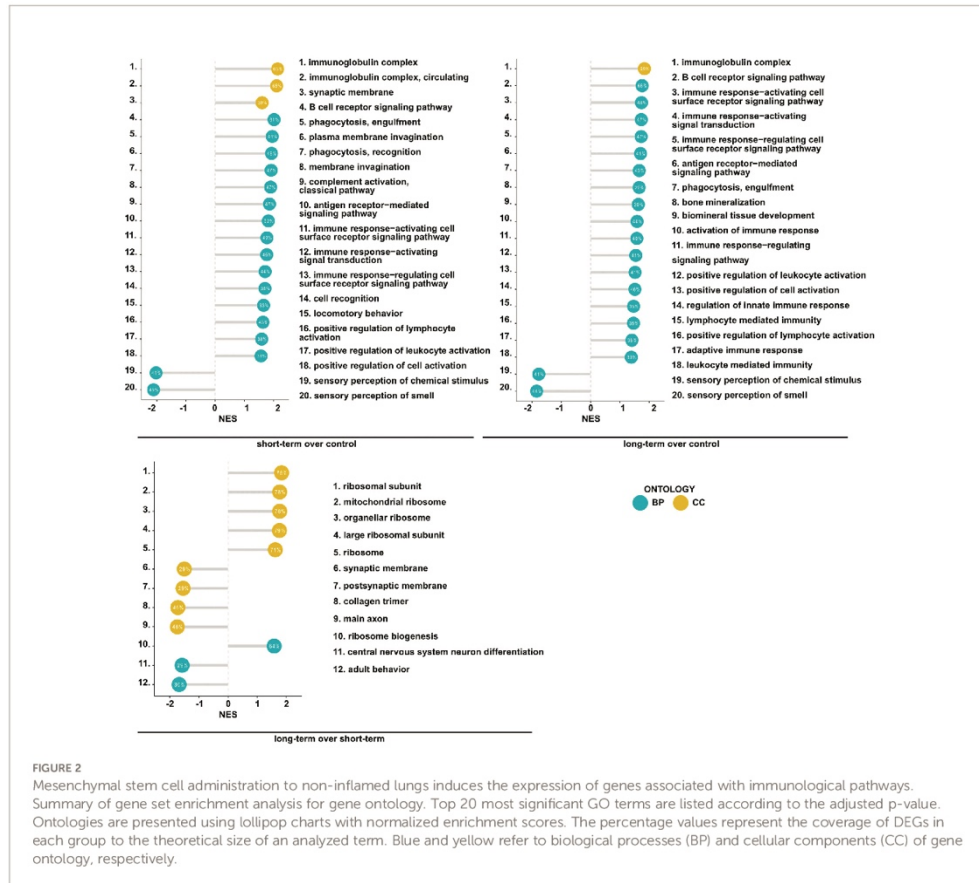


FIGURE 2 Mesenchymal stem cell administration to non-inflamed lungs induces the expression of genes associated with immunological pathways. Summary of gene set enrichment analysis for gene ontology. Top 20 most significant GO terms are listed according to the adjusted p-value. Ontologies are presented using lollipop charts with normalized enrichment scores. The percentage values represent the coverage of DEGs in each group to the theoretical size of an analyzed term. Blue and yellow refer to biological processes (BP) and cellular components (CC) of gene ontology, respectively.

system (Figure 4E). Importantly, clustered genes present a trend to be downregulated in the latter time point towards the level observed in the untreated controls. However, in the short-term model, we noted an upregulated expression of most analyzed genes. However, a relatively low number of genes were significantly upregulated (FDR < 0.05) in analyzed models in the cluster reflecting inflammation within the respiratory system (9 upregulated genes among 50 defined in the cluster, Figure 4E).

Commonly regulated genes form a low number of interactions

Having found longitudinal changes in the gene expression profiles among MSCs-treated groups, next, we aimed to focus on

the common genes for both short-term and long-term models. First, we found a low number of interactions among analyzed genes (Figure 5). The observed ones mainly reflect dysregulation of immune responses, namely dendritic cell, T cell, and B cell function (*Cd7*, *Cd37*, *Cd72*, *Cd79a*, *Spib*, and *Il-21r*, *Cxcr5*, *Cd5*, *Zbp1*). In addition, we observed interactions for ribosome biogenesis, function, and cell cycle (*Rrs1*, *Gpatch4*, *Trp35*, *Ncl*, *Rasl11a*, *Rbm38*, *Hist1h1b*), shock proteins (*Cirbp*, *Hspb6*), and circadian rhythm (*Dbp*, *Arntl*, *Npas2*, *Nfil3*) (Figure 5A). Furthermore, we analyzed the most significant genes with altered z-scores at the investigated time-points according to the Ingenuity Pathway Analysis. We found *Rap2b* relative expression as the one of most changed compared to the other delta expression of genes (Figure 5B). According to the Pathcards and Reactome database (<https://pathcards.genecards>.

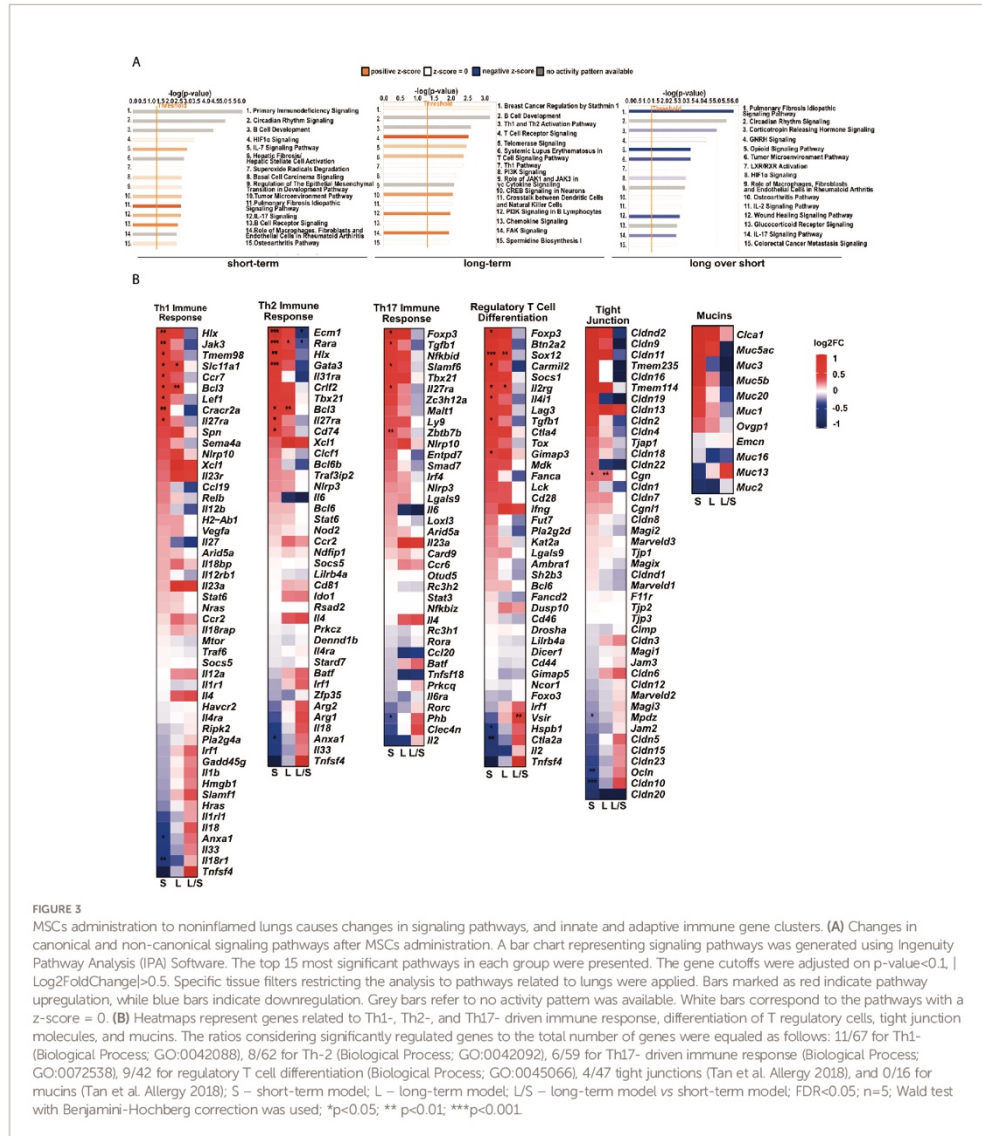
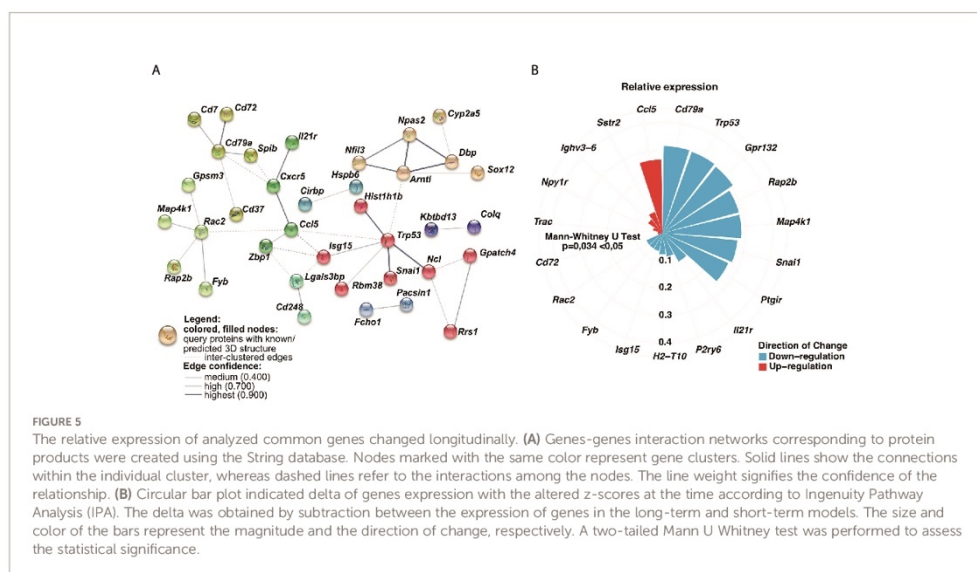


FIGURE 3
 MSCs administration to noninflamed lungs causes changes in signaling pathways, and innate and adaptive immune gene clusters. (A) Changes in canonical and non-canonical signaling pathways after MSCs administration. A bar chart representing signaling pathways was generated using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) Software. The top 15 most significant pathways in each group were presented. The gene cutoffs were adjusted on p -value < 0.1 , $|\text{Log}_2\text{FoldChange}| > 0.5$. Specific tissue filters restricting the analysis to pathways related to lungs were applied. Bars marked as red indicate pathway upregulation, while blue bars indicate downregulation. Grey bars refer to no activity pattern was available. White bars correspond to the pathways with a z -score = 0. (B) Heatmaps represent genes related to Th1-, Th2-, and Th17- driven immune response, differentiation of T regulatory cells, tight junction molecules, and mucins. The ratios considering significantly regulated genes to the total number of genes were equal as follows: 11/67 for Th1- (Biological Process; GO:0042088), 8/62 for Th-2 (Biological Process; GO:0042092), 6/59 for Th17- driven immune response (Biological Process; GO:0072538), 9/42 for regulatory T cell differentiation (Biological Process; GO:0045066), 4/47 tight junctions (Tan et al. Allergy 2018), and 0/16 for mucins (Tan et al. Allergy 2018); S – short-term model; L – long-term model; L/S – long-term model vs short-term model; FDR < 0.05 ; $n = 5$; Wald test with Benjamini-Hochberg correction was used; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

org; <https://reactome.org>; access date: 4th July 2022), *Rap2b* is predicted to be involved in the neutrophils degranulation pathway, which is linked with the reactive oxygen species production (18). Moreover, we also noted a relatively relevant change in *Trp53* (Figure 5B), which is also recognized as an important contributor to oxidative stress-induced necrosis (19).

Additionally, a significant change in *Gpr132* relative expression was observed, which is highly specific to infiltrating macrophages (20). Finally, we also observed a trend in a longitudinal decrease in the expression of the analyzed common genes (Figures 6A, B), which may indicate lung homeostasis reestablishment.

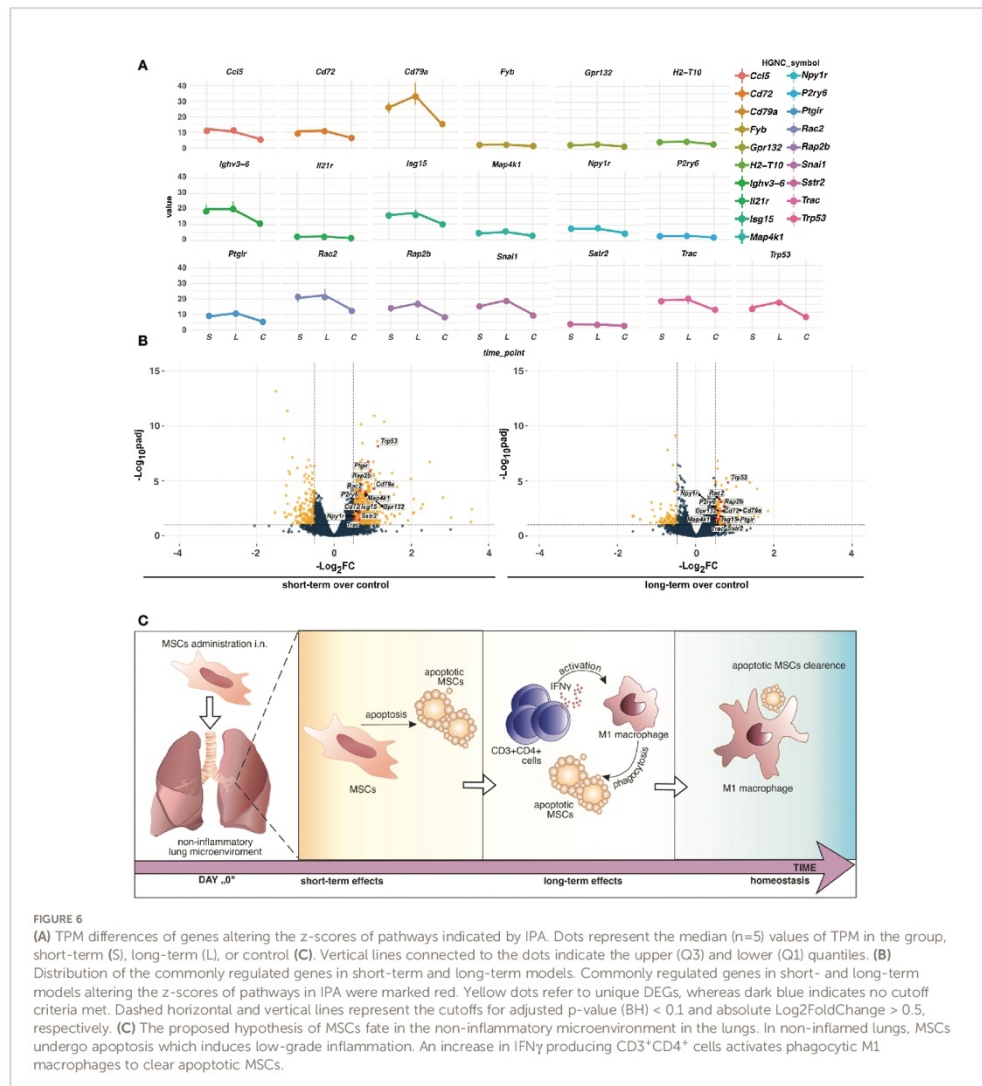


transcriptomic profiles indicating redox imbalance, hypoxia signaling pathway, and activation of macrophage's phagocytic function. Our results indicate induction of low-grade inflammation as a long-term effect of MSCs transfer associated with graft clearance.

It was previously shown that allogenic MSCs may preserve within the airways for up to 72h (12, 27–29). However, more recently, Ferrini *E et al.*, by using third-generation of lentiviral vectors, showed that bone marrow-derived MSCs can be detected within the lung even longer than 14 days post intratracheal and intravenous administration (30). This observation explains the reported long-lasting beneficial effects of MSCs transfer to inflamed lungs. Therefore, in our study, we evaluated the short-term and long-term effects of MSCs administration.

As mentioned above, upon transplantation MSCs may undergo differentiation supporting regeneration or healing processes or, in response to inflammatory stimuli, may act as potent regulators of inflammation (31–33). Interestingly, MSCs apoptosis has been acknowledged as a mechanism of their immunosuppressive function and is believed to be required for their therapeutic effectiveness (33–36). Chang *et al.* demonstrated that apoptotic MSCs effectively downregulate inflammation, oxidative stress, and histopathological alterations in the lungs and kidneys in the mice sepsis model (36). These results remain consistent with “the dying stem cell hypothesis” introduced by Thum *T. et al.*, which shows modulation of the local immune responses by apoptosis of transplanted stem cells (33). However, in our model, MSCs were transferred to the non-inflamed lungs and we observed signs of low-grade inflammation as the long-term effects. We hypothesized that

this effect might be associated with apoptotic graft or hetero-transplant clearance (37). This was additionally supported by observed transcriptional signatures in analyzed innate immune clusters, namely pattern recognition receptor signaling, macrophage activation, cellular response to oxidative stress, and phagocytosis. Our findings are partially in agreement with the recently published study by Preda MB *et al.*, who proposed the “hit and die” concept indicating transplanted MSCs activate the hypoxia signaling pathway in the recipient organ, and subsequently undergo caspase-3/7 mediated apoptosis (35). In correspondence to the study, Galleu A *et al.* stated the hypothesis that cytokine-dependent priming is not required for the generation of apoptotic MSCs and induction of immunosuppression (31). Consequently, at the transplantation site, locally recruited macrophages remove apoptotic MSCs in the phagocytosis process and orchestrate anti-inflammatory responses (31, 36). Notably, IFN γ is a critical agent in the induction and activation of pro-inflammatory and highly phagocytic classically activated (M1 polarized) macrophages (38). These cells were shown previously to play a central role in the MSC graft removal (12, 35). Graft clearance may be associated with the cytotoxic effect of immune cells to the differentiating MSCs or be a consequence of MSCs apoptosis in response to proinflammatory stimulation, including IFN γ -mediated signaling (35). On the other hand, increased Th1 responses, associated with IFN γ release, affect epithelial barrier integrity by downregulation of the tight junction protein expression (39, 40). This explains observed in our study, decreased expression of occludin and claudin 3 in the long-term model. Furthermore, changes in the expression of analyzed clusters of genes in the latter time-point resemble the control pattern, which



may indicate the gradual impairment of local low-grade inflammation induced upon MSCs apoptosis execution and graft removal.

Conclusions

In summary, here, we showed short-term and long-term effects of *i.n.* administration of the MSCs to the non-inflamed lungs. Our

results suggest that in the steady-state MSCs may undergo apoptosis in the non-inflammatory microenvironment. In turn, low-grade inflammation is induced in the late phases after MSC administration. Consequently, IFN- γ -producing T cells may activate innate immune cells to efferocytosis, subsequently leading to the re-establishment of lung tissue homeostasis (Figure 6C). Thus, our results partially support “dying stem cells” and “hit and die” concepts. However, further studies are needed to fully understand the fate of MSCs within the lung microenvironment.

Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE200028>.

Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by Ethical Committee at the Medical University of Białystok. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study. The animal study was reviewed and approved by Local Ethical Committee in Olsztyn, Poland.

Author contributions

Study design, AE and MM. Data collection, MT, MN, AZ, ASta, KG, NS, ASza, UK, AT, JR, MK, and AE. Data analysis and interpretation, MT, AJ, MN, AK, MK, and AE. Manuscript draft, MT, AJ, and AE. Supervision and coordination of the study, MM and AE. Review of the manuscript, CA, MS, MM, and AE. Data validation, MS, CA, MM, and AE. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

The publication was written during doctoral studies under the project № POWR.03.02.00-00-I050/16 co-funded from European Union funds, POWER 2014-2020. The article has been supported by the National Science Centre, Poland, Grant No. 2020/37/N/NZ5/04144. AJ and AZ were supported by the program "Best of the Best 4.0 (original name: Najlepsi z Najlepszych 4.0)" founded by the Ministry of Education and Science № N/POWER/21/001/1199. This study was conducted with the use of equipment purchased by the Medical University of Białystok as part of the RPOWP 2007–2013 funding, Priority I, Axis 1.1, contract no. UDA- RPPD.01.01.00-20-001/15-00 dated 26.06.2015.

Acknowledgments

All authors recognized Agnieszka Popielska MSc and the employees of the Center of Experimental Medicine for technical support.

Conflict of interest

MT reports grant from National Science Centre, Poland, during the conduct of the study, grants from European Union funds, POWER 2014-2020, grants from National Centre for Research and Development, outside the submitted work. AJ and AZ reports grants and non-financial support from Ministry of Education and Science, Poland. CA reports research grants from the Swiss National Science Foundation, European Union (EU CURE), Novartis Research Institutes (Basel, Switzerland), Stanford University (Redwood City, Calif), and SciBase (Stockholm, Sweden), he is the Co-Chair for EAACI Guidelines on Environmental Science in Allergic diseases and Asthma, and serves on the Advisory Boards of Sanofi/Regeneron, Novartis, GlaxoSmithKline, and SciBase, and is the Editor-in-Chief of *Allergy*, outside the submitted work. MS reports grants from Swiss National Science Foundation, grants from GSK, grants from Novartis, personal fees from AstraZeneca, outside the submitted work. MM reports grants from National Centre for Research and Development, grant from Medical Research Agency, lecture fees from AstraZeneca, Berlin-Chemie/Menarini, GSK, Takeda, Shire, Teva, Lek-Am, Celon, Sandoz, Pfizer, Hal Allergy, and had reimbursed conference costs and travel by Berlin-Chemie/Menarini, outside the submitted work. AE reports grant from National Science Centre, during the conduct of the study, grants from National Centre for Research and Development.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.967487/full#supplementary-material>

References

- Tynecka M, Moniuszko M, Eljaszewicz A. Old friends with unexploited perspectives: Current advances in mesenchymal stem cell-based therapies in asthma. *Stem Cell Rev Rep* (2021) 17(4):1323–42. doi: 10.1007/s12015-021-10137-7
- Wei Y, Chen X, Zhang H, Su Q, Peng Y, Fu Q, et al. Efficacy and safety of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for chronic antibody-mediated rejection after kidney transplantation- a single-arm, two-Dosing-Regimen, phase I/II study. *Front Immunol* (2021) 12:662441. doi: 10.3389/fimmu.2021.662441
- Liu Q, Zheng H, Chen X, Peng Y, Huang W, Li X, et al. Human mesenchymal stromal cells enhance the immunomodulatory function of CD8(+)/CD28(-) regulatory T cells. *Cell Mol Immunol* (2015) 12(6):708–18. doi: 10.1038/cmi.2014.118
- Wang H, Li D, Zhai Z, Zhang X, Huang W, Chen X, et al. Characterization and therapeutic application of mesenchymal stem cells with neuroesodermal origin from human pluripotent stem cells. *Theranostics* (2019) 9(6):1683–97. doi: 10.7150/thno.30487
- Piekarska K, Urban-Wójciuk Z, Kurkowiak M, Pelikant-Mafecka I, Schumacher A, Sakowska J, et al. Mesenchymal stem cells transfer mitochondria to allogeneic tregs in an HLA-dependent manner improving their immunosuppressive activity. *Nat Commun* (2022) 13(1):856. doi: 10.1038/s41467-022-28338-0
- Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* (1966) 16(3):381–90. doi: 10.1024/dev.16.3.381
- Fridenshtén A, Piatetski-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Arkh Anat Gistol Embriol* (1969) 56(3):3–11. doi: 10.1024/dev.16.3.381
- Nakao Y, Fukuda T, Zhang Q, Sanui T, Shinjo T, Kou X, et al. Exosomes from TNF- α -treated human gingiva-derived MSCs enhance M2 macrophage polarization and inhibit periodontal bone loss. *Acta Biomater* (2021) 122:306–24. doi: 10.1016/j.actbio.2020.12.046
- Wang F, Chen X, Li J, Wang D, Huang H, Li X, et al. Dose- and time-dependent effects of human mesenchymal stromal cell infusion on cardiac allograft rejection in mice. *Stem Cells Dev* (2021) 30(4):203–13. doi: 10.1089/scd.2019.0300
- Kehl D, Generali M, Mallone A, Heller M, Uldry AC, Cheng P, et al. Proteomic analysis of human mesenchymal stromal cell secretomes: a systematic comparison of the angiogenic potential. *NPJ Regen Med* (2019) 4:8. doi: 10.1038/s41536-019-0070-y
- Obtulowicz P, Lech W, Strojek L, Sarnowska A, Domanska-Janik K. Induction of endothelial phenotype from wharton's jelly-derived MSCs and comparison of their vasoprotective and neuroprotective potential with primary WJ-MSCs in CA1 hippocampal region ex vivo. *Cell Transplant* (2016) 25(4):715–27. doi: 10.3727/096368915X690369
- Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp FC, Geissler EK, Schlitt HJ, et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol* (2012) 3:297. doi: 10.3389/fimmu.2012.00297
- Noronha NC, Mizukami A, Caliri-Oliveira C, Cominal JG, Rocha JLM, Covas DT, et al. Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cell Res Ther* (2019) 10(1):131. doi: 10.1186/s13287-019-1224-y
- Yen BL, Yen ML, Wang LT, Liu KJ, Sytwu HK. Current status of mesenchymal stem cell therapy for immune/inflammatory lung disorders: Gleaning insights for possible use in COVID-19. *Stem Cells Transl Med* (2020) 9:1163–73. doi: 10.1002/sctm.20-0186
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* (2013) 29(1):15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635
- Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* (2014) 15(12):550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
- Wu T, Hu E, Xu S, Chen M, Guo P, Dai Z, et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *Innovation (N Y)* (2021) 2(3):100141. doi: 10.1016/j.xinn.2021.100141
- Lominadze G, Powell DW, Luerman GC, Link AJ, Ward RA, McLeish KR. Proteomic analysis of human neutrophil granules. *Mol Cell Proteomics* (2005) 4(10):1503–21. doi: 10.1074/mcp.M500143-MCP200
- Vaseva AV, Marchenko ND, Ji K, Tsirka SE, Holzmann S, Moll UM. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell* (2012) 149(7):1536–48. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.014
- Kern K, Schäfer SMG, Cohnen J, Pierre S, Osthus T, Tarighi N, et al. The G2A receptor controls polarization of macrophage by determining their localization within the inflamed tissue. *Front Immunol* (2018) 9:2261. doi: 10.3389/fimmu.2018.02261
- Wong AP, Dutly AE, Sacher A, Lee H, Hwang DM, Liu M, et al. Targeted cell replacement with bone marrow cells for airway epithelial regeneration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2007) 293(3):L740–52. doi: 10.1152/ajplung.00050.2007
- Wong AP, Keating A, Lu WY, Duchesneau P, Wang X, Sacher A, et al. Identification of a bone marrow-derived epithelial-like population capable of repopulating injured mouse airway epithelium. *J Clin Invest* (2009) 119(2):336–48. doi: 10.1172/JCI36882
- Gupta N, Su X, Popov B, Lee JW, Serikov V, Matthay MA. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol* (2007) 179(3):1855–63. doi: 10.4049/jimmunol.179.3.1855
- Florea V, Rieger AC, DiFede DL, El-Khorazaty J, Natsumeda M, Banerjee MN, et al. Dose comparison study of allogeneic mesenchymal stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy (The TRIDENT study). *Circ Res* (2017) 121(11):1279–90. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311827
- Feng Y, Huang J, Wu J, Xu Y, Chen B, Jiang L, et al. Safety and feasibility of umbilical cord mesenchymal stem cells in patients with COVID-19 pneumonia: A pilot study. *Cell Prolif* (2020) 53(12):e12947. doi: 10.1111/cpr.12947
- Meng F, Xu R, Wang S, Xu Z, Zhang C, Li Y, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell therapy in patients with COVID-19: a phase I clinical trial. *Signal Transduct Target Ther* (2020) 5(1):172. doi: 10.1038/s41392-020-00286-5
- Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* (2003) 101(8):2999–3001. doi: 10.1182/blood-2002-06-1830
- Kraitchman DL, Tatsumi M, Gilson WD, Ishimori T, Kedzioriek D, Walczak P, et al. Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. *Circulation* (2005) 112(10):1451–61. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.537480
- Masterson CH, Tabuchi A, Hogan G, Fitzpatrick G, Kerrigan SW, Jerkic M, et al. Intra-vital imaging of mesenchymal stromal cell kinetics in the pulmonary vasculature during infection. *Sci Rep* (2021) 11(1):5265. doi: 10.1038/s41598-021-83894-7
- Ferrini E, Stellari FF, Franceschi V, Macchi F, Russo L, Murgia A, et al. Persistence of mesenchymal Stromal/Stem cells in lungs. *Front Cell Dev Biol* (2021) 9:709225. doi: 10.3389/fcell.2021.709225
- Galleu A, Riffo-Vasquez Y, Trento C, Lomas C, Dolcetti L, Cheung TS, et al. Apoptosis in mesenchymal stromal cells induces *in vivo* recipient-mediated immunomodulation. *Sci Transl Med* (2017) 9(416):1–17. doi: 10.1126/scitranslmed.aam7828
- Sung PH, Chang CL, Tsai TH, Chang LT, Leu S, Chen YL, et al. Apoptotic adipose-derived mesenchymal stem cell therapy protects against lung and kidney injury in sepsis syndrome caused by cecal ligation puncture in rats. *Stem Cell Res Ther* (2013) 4(6):155. doi: 10.1186/sct385
- Thum T, Bauersachs J, Poole-Wilson PA, Volk HD, Anker SD. The dying stem cell hypothesis: immune modulation as a novel mechanism for progenitor cell therapy in cardiac muscle. *J Am Coll Cardiol* (2005) 46(10):1799–802. doi: 10.1016/j.jacc.2005.07.053
- Pang SHM, D'Rozario J, Mendonca S, Bhuvan T, Payne NL, Zheng D, et al. Mesenchymal stromal cell apoptosis is required for their therapeutic function. *Nat Commun* (2021) 12(1):6495. doi: 10.1038/s41467-021-26834-3
- Preda MB, Neculachi CA, Fenyo IM, Vacaru AM, Publik MA, Simionescu M, et al. Short lifespan of syngeneic transplanted MSC is a consequence of *in vivo* apoptosis and immune cell recruitment in mice. *Cell Death Dis* (2021) 12(6):566. doi: 10.1038/s41419-021-03839-w
- Chang CL, Leu S, Sung HC, Zhen YY, Cho CL, Chen A, et al. Impact of apoptotic adipose-derived mesenchymal stem cells on attenuating organ damage and reducing mortality in rat sepsis syndrome induced by cecal puncture and ligation. *J Transl Med* (2012) 10:244. doi: 10.1186/1479-5876-10-244
- Bhat P, Leggett G, Waterhouse N, Frazer IH. Interferon- γ derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell Death Dis* (2017) 8(6):e2836. doi: 10.1038/cddis.2017.67
- Eljaszewicz A, Wiese M, Helmin-Basa A, Jankowski M, Gackowska L, Kubiszewska I, et al. Collaborating with the enemy: function of macrophages in the development of neoplastic disease. *Mediators Inflamm* (2013) 2013:831387. doi: 10.1155/2013/831387
- Soyka MB, Wawrzyniak P, Eiwegger T, Holzmann D, Treis A, Wanke K, et al. Defective epithelial barrier in chronic rhinosinusitis: the regulation of tight junctions by IFN- γ and IL-4. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 130(5):1087–96.e10. doi: 10.1016/j.jaci.2012.05.052
- Akdis CA. Does the epithelial barrier hypothesis explain the increase in allergy, autoimmunity and other chronic conditions? *Nat Rev Immunol* (2021) 21:739–51. doi: 10.1038/s41577-021-00538-7

The short-term and long-term effects of intranasal mesenchymal stem cell administration to noninflamed mice lung

Marlena Tynecka¹, Adrian Janucik¹, Magdalena Niemira², Arkadiusz Zbikowski³, Nino Stocker⁴, Agnieszka Tarasik⁵, Aleksandra Starosz¹, Kamil Grubczak¹, Anna Szalkowska², Urszula Korotko⁶, Joanna Reszec⁵, Mirosław Kwasniewski⁶, Adam Kretowski^{2,7}, Cezmi Akdis⁴, Milena Sokolowska⁴, Marcin Moniuszko^{1,8,*}, †, Andrzej Eljaszewicz^{1,*}, †

¹Department of Regenerative Medicine and Immune Regulation, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

²Clinical Research Centre, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

³Department of Medical Biology, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

⁴Swiss Institute of Allergy and Asthma Research, University of Zurich, Davos, Switzerland

⁵Department of Medical Pathomorphology, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

⁶Centre for Bioinformatics and Data Analysis, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

⁷Department of Endocrinology, Diabetology and Internal Medicine, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

⁸Department of Allergology and Internal Medicine, Medical University of Białystok, Białystok, Poland

†These authors share senior authorship.

* Correspondence:

Andrzej Eljaszewicz, PhD

Department of Regenerative Medicine and Immune Regulation

Medical University of Białystok, Białystok, Poland

Ul. Waszyngtona 13, 15-269 Białystok, Poland

Email: andrzej.eljaszewicz@umb.edu.pl

Prof. Marcin Moniuszko, MD PhD

Department of Regenerative Medicine and Immune Regulation

Medical University of Białystok,

Ul. Waszyngtona 13, 15-269 Białystok, Poland

Department of Allergology and Internal

Medicine, Medical University of Białystok,

Ul. M. Skłodowskiej-Curie 24a, Białystok, 15-276 Białystok,

Poland Email: marcin.moniuszko@umb.edu.pl

Supplementary materials and methods

Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells isolation and culture

Mesenchymal stem cells were isolated from adipose tissue obtained from the bariatric patients (n=5) admitted to the 1st Clinical Department of General and Endocrinology Surgery, Medical University of Bialystok. Harvested adipose tissue was incubated with collagenase IV (Gibco) in standard cell culture conditions (37°C, 5% CO₂) for 45 minutes followed by inactivation in 10% fetal bovine serum (FBS, PAN Biotech) in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, PAN Biotech). Next adipose tissue was filtered through strainers (100µM pore size) and centrifuged at 400g for 5 minutes. Isolated cells were cultured in Mesenchymal Stem Cells Basal Medium (ATCC) supplemented with Mesenchymal Stem Cell Growth Kit for Adipose, Umbilical, and Bone Marrow-derived MSCs (ATCC) up to 3rd passage. Isolated adipose tissue-derived MSCs fulfill the following minimal criteria proposed by the International Society for Cellular Therapy: 1) adhere to the plastic surface in cell culture; 2) express at least CD73, CD90, and CD105, while they are negative for CD45 and HLA-DR; 3) differentiate into adipocytes, osteocytes, and chondrocytes. Expanded adipose tissue-derived MSCs cells were subjected to the experimental mice model (500 000 cells/transfer, with viability higher than 95%). Cell viability and density were assessed by using trypan blue in the Burker chamber by two independent scientists.

Adipose tissue-derived MSCs characterization in vitro

The phenotype and multipotency properties of isolated MSCs were confirmed prior to implementation in the experimental mice model using the following methods.

- *Flow cytometry analysis of adipose tissue-derived MSCs phenotype*

To confirm the specific phenotype of MSCs, isolated cells were incubated with monoclonal antibodies conjugated with fluorochrome according to standard protocol. For staining, appropriate FMO control was performed. The antibodies used for MSCs phenotype confirmation were listed in Table S1. Samples were acquired using FACSCalibur (Becton Dickinson) and analyzed with FlowJo v.10 (BD Biosciences).

Supplementary Table S1. Antibodies used to confirm the adipose tissue-derived MSCs phenotype.

ANTIBODIES	CLONE	SOURCE	IDENTIFIER
anti-human CD73 FITC	AD2	BioLegend	Cat. 344016
anti-human CD90 PE	5E10	BioLegend	Cat. 328110
anti-human CD105 APC	43A3	BioLegend	Cat. 323208
anti-human CD45 PerCP	2D1	BioLegend	Cat. 368506
anti- human HLA-DR APC	TU36	BD Pharmingen	Cat. 559868

- *Assessment of multipotency of adipose tissue-derived MSCs*

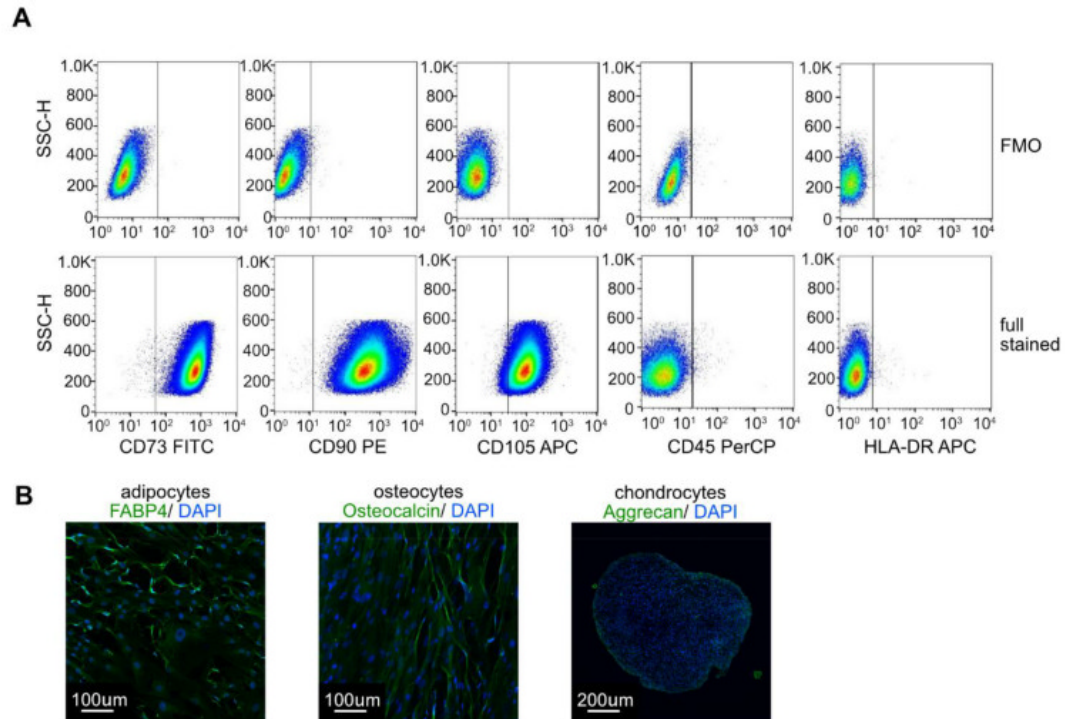
Differentiation of adipose tissue-derived MSCs to mesodermal lineage cells was verified using the Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit (R&D Systems, Cat. SC006) according to the provided protocol. MSCs were incubated in the dedicated adipocytes, osteocytes, and chondrocytes differentiation media for up to 21 days. To analyze the differentiation into three derivatives, specific markers provided in the kit were used: adipocyte marker (Goat Anti-Mouse FABP4 Antigen Affinity-purified Polyclonal Antibody), osteocyte marker (Mouse Anti-Human Osteocalcin Monoclonal Antibody), and chondrocyte marker (Goat Anti-Human Aggrecan Antigen Affinity-purified Polyclonal Antibody). Adipocytes, osteocytes, and chondrocytes specimens were acquired using Olympus FV1200 confocal microscope (Olympus).

Supplementary Table S2. Antibodies used in the study

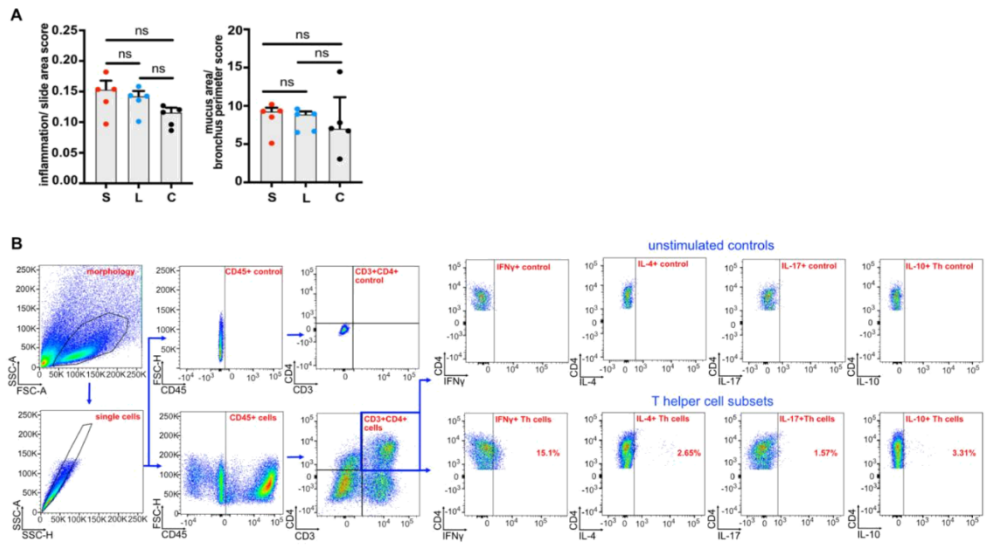
ANTIBODIES	CLONE	SOURCE	IDENTIFIER
Flow cytometry staining			
anti-mouse CD45 PE	30-F11	Biologend	Cat. 103106
anti-mouse CD3e	145-2C11	Biologend	Cat. 100320
anti-mouse CD4 PE/Dazzle 594	RM4-5	Biologend	Cat. 100566
anti-mouse IFNg PerCP-Cy5.5	XMG1.2	eBioscience	Cat.45-7311-80
anti-mouse IL-4 APC	11B11	eBioscience	Cat.17-7041-82
anti-mouse IL-17A Alexa Fluor 488	eBio17B7	eBioscience	Cat. 53-7177-81
anti-mouse IL-10 APC/Cy7	JES5-16E3	Biologend	Cat. 505036
Immunocytochemistry (ICC) staining			
polyclonal rabbit anti- ZO-1	-	Invitrogen	Cat. 40-2200
monoclonal mouse anti- Occludin	OC-3F10	Invitrogen	Cat. 33-1500
polyclonal rabbit anti-Claudin 3	-	Invitrogen	Cat. 34-1700
goat anti-mouse IgG (H+L) secondary Alexa Fluor 488	-	Invitrogen	Cat. A-11001
goat anti-rabbit IgG (H+L) secondary Alexa Fluor 488	-	Invitrogen	Cat. A-11008

Supplementary Table S3 List of excluded RIKEN genes from the transcriptomic analysis considering commonly regulated genes in the short- and long-term group.

Ensembl	HGNC
ENSMUSG00000028536	2610528J11Rik
ENSMUSG00000043168	4930426D05Rik
ENSMUSG00000062319	Gm10115
ENSMUSG00000071540	3425401B19Rik
ENSMUSG00000075514	Gm13375
ENSMUSG00000075538	Gm10855
ENSMUSG00000097194	9330175E14Rik
ENSMUSG00000097296	Gm26532
ENSMUSG00000101365	Gm19325
ENSMUSG00000101693	Gm19461
ENSMUSG00000102142	Gm26930
ENSMUSG00000104476	Gm38211
ENSMUSG00000105272	Gm43071
ENSMUSG00000105771	2900064K03Rik
ENSMUSG00000105985	Gm42993
ENSMUSG00000106237	Gm8066
ENSMUSG00000107290	Gm43282
ENSMUSG00000108046	Gm43924
ENSMUSG00000108443	Gm44510
ENSMUSG00000108456	4732496C06Rik
ENSMUSG00000109157	Gm44829
ENSMUSG00000109363	Gm44668
ENSMUSG00000112307	Gm48751
ENSMUSG00000114501	Gm48582
ENSMUSG00000114608	Gm36161
ENSMUSG00000117729	Gm5242

Supplementary figures

Supplementary Figure S1. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells A. phenotype confirmation and B. multipotency verification. **A.** Adipose tissue-derived MSCs were characterized by the expression of CD73, CD90, and CD105 markers, while they are negative for CD45 and HLA-DR (n=5). **B.** Representative photos of confocal staining of adipose tissue-derived MSCs differentiated to mesodermal lineage cells. Cells were visualized using specific antibodies, namely FABP4 (adipocyte marker), osteocalcin (osteocytes marker), and aggrecan (chondrocyte marker); DAPI- blue, nucleus; Alexa Fluor 488- green, positive signal of analyzed markers.



Supplementary Figure S2. A. Summary of quantification results of hematoxylin & eosin (upper bar plot) and periodic acid-shiff staining (lower barplot). S – short-term model; L – long-term model; C – control; U Mann-Whitney test was used to assess the differences among investigated groups; $p < 0.05$ was considered statistically significant; ns – not significant; $n = 5$ B. Representative gating strategy of IFN γ , IL-4, IL-17, or IL-10 producing CD3+CD4+ T cell. The cells were gated according to forward (FSC), and side (SSC) scatter (morphology) followed by doublets discrimination (single cells). Next, CD45- cells were excluded from the analysis (CD45+ cells), and CD3+CD4+ cells were gated (CD3+CD4+ cells). Finally, cytokine-producing cells were gated according to the unstimulated control. FlowJo v.10 software was used for data analysis.

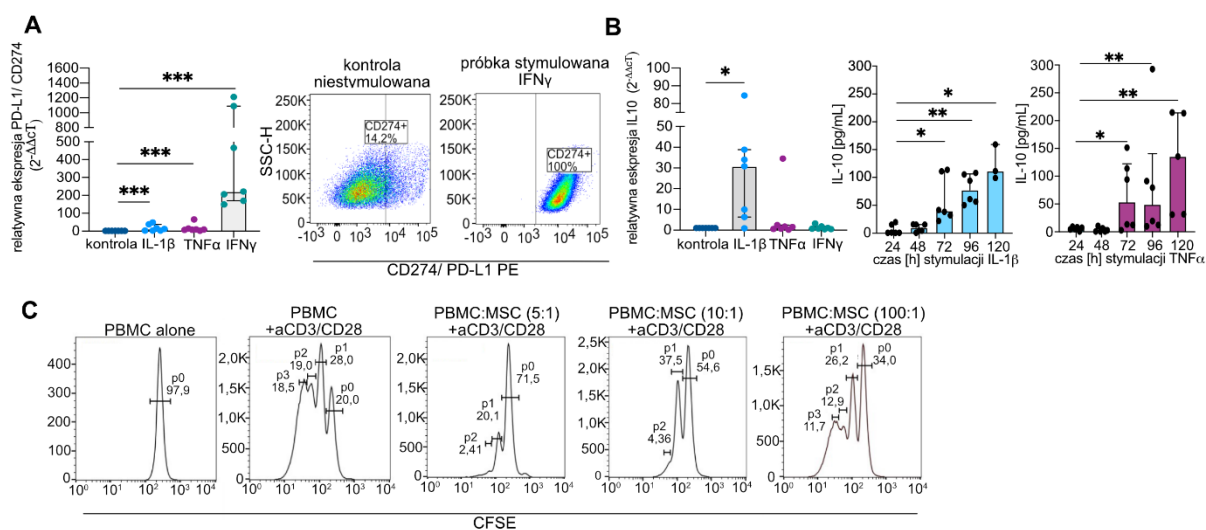
VII) NIEOPUBLIKOWANE DANE WŁĄCZONE DO ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1) Potwierdzenie właściwości immunosupresyjnych MSC pochodzących z ludzkiej tkanki tłuszczowej w warunkach *in vitro*

Po potwierdzeniu minimalnych kryteriów pozwalających na kwalifikację MSC, w kolejnym etapie badań, a przed rozpoczęciem kolejnej fazy *in vivo*, postanowiłam ocenić czy izolowane przeze mnie komórki posiadają zdolności regulujące odpowiedź układu immunologicznego. MSC stymulowano cytokinami prozapalnymi (IL-1 β , TNF α , IFN γ), które jak już wspomniałam we wstępie, indukują właściwości immunosupresyjne tych komórek.

Stymulacja MSC za pomocą IFN γ najefektywniej indukowała ekspresję genu *CD274* (*PD-L1*) w MSC, w porównaniu do komórek stymulowanych TNF α czy IL-1 β (Rycina 6A). Obserwacje te zostały również potwierdzone na poziomie białka przy pomocy cytometrii przepływowej (Rycina 6A). Stymulacja MSC za pomocą IL-1 β była z kolei najbardziej efektywna w indukcji ekspresji *IL10*, podczas gdy takich efektów nie zaobserwowano po stymulacji TNF α i IFN γ (Rycina 6B). Co ciekawe, na poziomie białka zaobserwowałam rosnące stężenia IL-10 w supernatancie hodowlanym po stymulacji zarówno IL-1 β oraz TNF α (Rycina 6B). W kolejnym etapie badania potwierdziłam potencjał immunosupresyjny MSC wykorzystując test proliferacji limfocytów stymulowanych mitogenem, a mianowicie przeciwciałami aktywującymi receptory CD3 oraz CD28. Zgodnie z przewidywaniami, wykazałam, iż w obecności MSC proliferacja limfocytów jest znacznie obniżona w porównaniu do komórek inkubowanych bez ich obecności (Rycina 6C).

Uzyskane wyniki potwierdzają, że MSC izolowane z ludzkiej tkanki tłuszczowej nabierają aktywności immunosupresyjnych poprzez stymulację mediatorami stanu zapalnego. Pozwoliło to na ich wykorzystanie w dalszych badaniach, których celem była ocena efektów działania tych komórek w eksperymentalnym modelu astmy.



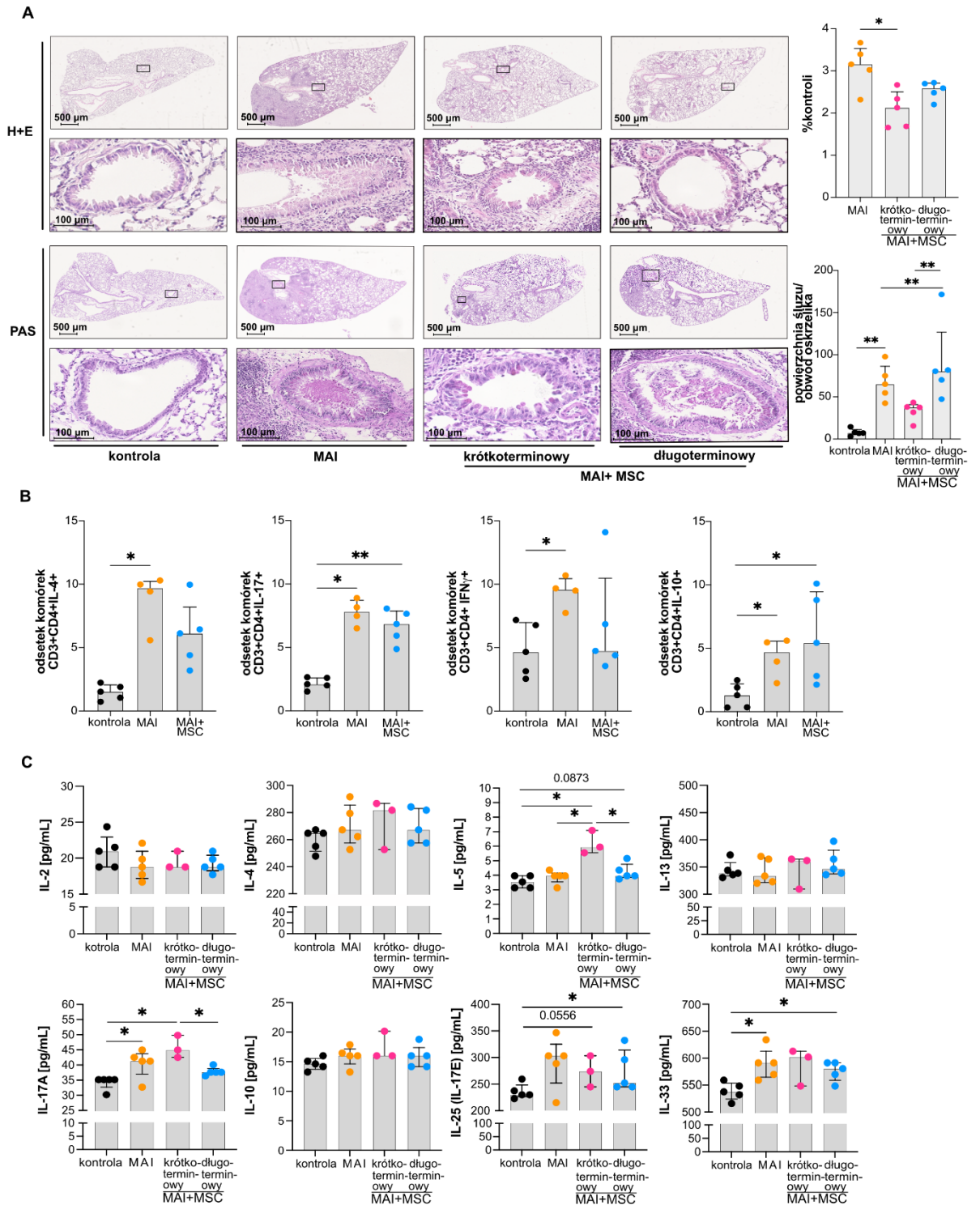
Rycina 6. A. Ocena ekspresji PD-L1 (CD274) po stymulacji cytokinami prozapalnymi (IL-1 β , TNF α , IFN γ) na poziomie RNA (qPCR) i białka (cytometria przepływowa). **B.** Ocena ekspresji IL-10 po stymulacji cytokinami prozapalnymi (IL-1 β , TNF α , IFN γ) na poziomie RNA (qPCR) i białka (ELISA). **C.** Analiza statystyczna przeprowadzono z użyciem nieparametrycznego testu U Mann Whitney'a; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. **C.** Analiza cytometryczna przedstawiająca zahamowanie proliferacji PBMC stymulowanych anti-CD3/CD28 w obecności różnych ilości MSCs (5:1; 10:1; 100:1); PBMC alone- komórki nie poddane stymulacji. Oznaczenia p0, p1, p2, p3 odpowiadają kolejnym populacjom komórek proliferujących komórek, gdzie p0 jest populacją wyjściową (n=3).

2) Efekty przez nosowego podawania mezenchymalnych komórek macierzystych w eksperymentalnym modelu astmy indukowanym ekstraktem roztocza kurzu domowego

W pierwszym etapie badań potwierdziłam, iż przez nosowe podanie ekstraktu HDM w dawce 10 μ g indukuje zapalenie dolnych dróg oddechowych o pożądanych cechach odzwierciedlając zapalenie astmatyczne obserwowane u ludzi z endotypem mieszanym (eozynofilowo/neutrofilowym). Zaobserwowałam nacieki zapalne w obrębie tkanki płucnej oraz zwiększoną produkcję śluzu (Rycina 7A). W kolejnym etapie, oceniłam wpływ podania MSC pochodzących z ludzkiej tkanki tłuszczowej na rozwój zapalenia dolnych dróg oddechowych. Zaobserwowano, iż MSC ograniczają nacieki zapalne tkanki płucnej (Rycina 7A). Efekt ten pomimo widocznego trendu w obu wykorzystanych modelach osiągnął poziom istotności tylko w przypadku krótkoterminowej aktywności MSC.

Ponadto, zaobserwowałam obniżenie produkcji śluzu jako krótkoterminowy efekt działania MSC (Rycina 7A).

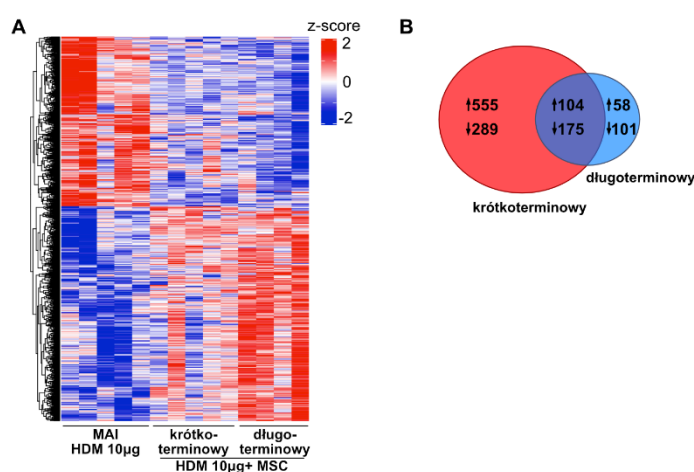
W zakresie dystrybucji limfocytów T efektorowych w obrębie płuc, zaobserwowałam wzrost odsetka limfocytów T produkujących IL-4, IL-17, IFN γ oraz IL-10 po indukcji zapalenia ekstraktem HDM (Rycina 7B). Co ciekawe, podanie MSC w modelu długoterminowym nie powodowało istotnych statystycznie zmian w odsetkach analizowanych populacji limfocytów T efektorowych (Rycina 7B). Zaobserwowano jedynie trend w kierunku obniżenia odsetka limfocytów T produkujących IL-4 i IFN γ (Rycina 7B). Nie zaobserwowałam również istotnych zmian w profilu cytokinowym popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych po przez nosowym podaniu MSC (Rycina 7C).



Rycina 7. Przez nosowe (*i.n.*) podanie MSCs pochodzących z tkanki tłuszczowej ogranicza zapalenie w eksperymentalnym modelu astmy. **A.** Reprezentatywne zdjęcia preparatów tkanki płucnej wybarwione hematoksyliną i eozyną oraz w metodzie PAS wraz z ich analizą w programie ImageJ. **B.** Podsumowanie analiz cytometrycznych odsetków [%] populacji limfocytów efektorowych produkujących IL-4, IL-17, IFN γ lub IL-10 po podaniu MSCs *i.n.* w modelu długoterminowym. **C.** Podsumowanie analiz zmian w profilu cytokinowym popłuczyn pęcherzykowo-oskrzelowych po podaniu MSC. Stężenia analitów zostały wyrażone w pg/mL. Różnice pomiędzy badanymi grupami zostały ocenione nieparametrycznym testem U Mann-Whitney'a.

Uzyskane wyniki badań potwierdziły, iż przez nosowe podanie MSC prowadzi do ograniczenia zapalenia dolnych dróg oddechowych oraz produkcji śluzu. Nie zaobserwowałam natomiast widocznych zmian w odsetkach komórek efektorowych w obrębie płuc. Dlatego aby lepiej zrozumieć efekty przez nosowego podania MSC do płuc z wyindukowanym zapaleniem mieszanym eozynofilowo/neutrofilowym postanowiłam ocenić profil transkryptomyczny tkanki płucnej.

Zaobserwowałam istotne różnice w profilu ekspresji genów w obu analizowanych modelach po podaniu MSC w porównaniu do myszy nieotrzymujących komórek (Rycina 8A). Po podaniu MSC w modelu krótkoterminowym 844 geny ulegały zróżnicowanej ekspresji, podczas gdy w modelu długoterminowym specyficznie zmienionych genów było jedynie 159 (Rycina 8B). W obu analizowanych modelach ekspresja 279 genów była regulowana w taki sam sposób (Rycina 8B).

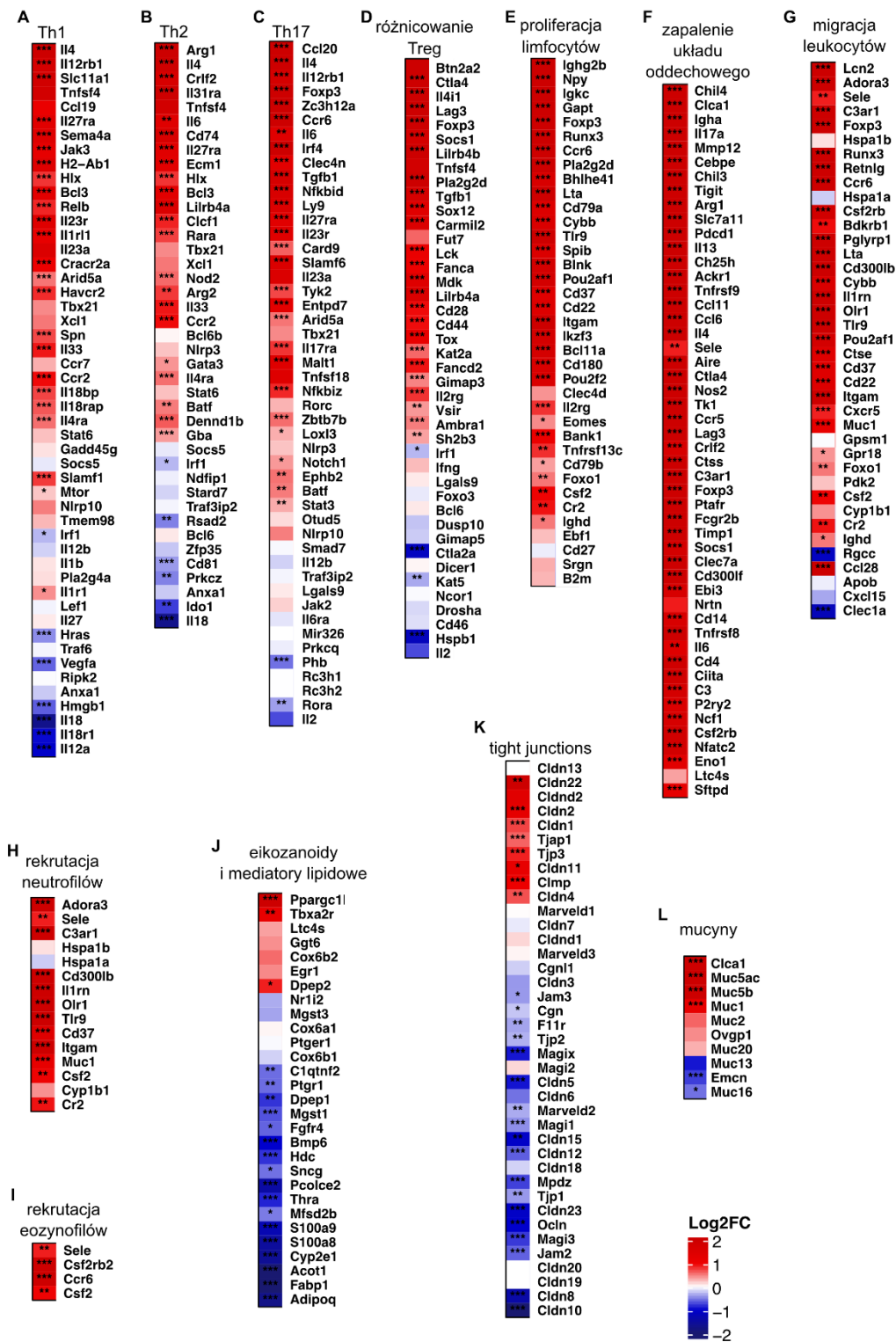


Rycina 8. A. Zmiany w profilu transkryptomycznym płuc po podaniu MSC *i.n.* w eksperymenralnym modelu astmy eozynofilowej. *Heatmap*'a obrazuje wszystkie geny o zróżnicowanej ekspresji pomiędzy badanymi grupami (n=1282). DEG zostały zidentyfikowane na podstawie $|\text{Log}_2\text{FoldChange}| > 0,5$ i skorygowanej wartości p value < 0.1 . W analizie zastosowano odcięcia z dopasowanymi identyfikatorami HGNC oraz pełne grupowanie (klasterowanie) powiązań. **B.** *Venn Diagram* prezentujący wspólne oraz zróżnicowane geny w modelu krótko- (czerwony) oraz długoterminowym (niebieski). Strzałki wskazują na zwiększenie lub zmniejszenie ekspresji DEG.

Następnie podobnie do wcześniej przeprowadzonych i opublikowanych na łamach *Frontiers in Immunology* analiz transkryptomicznych, oceniłam w jaki sposób geny

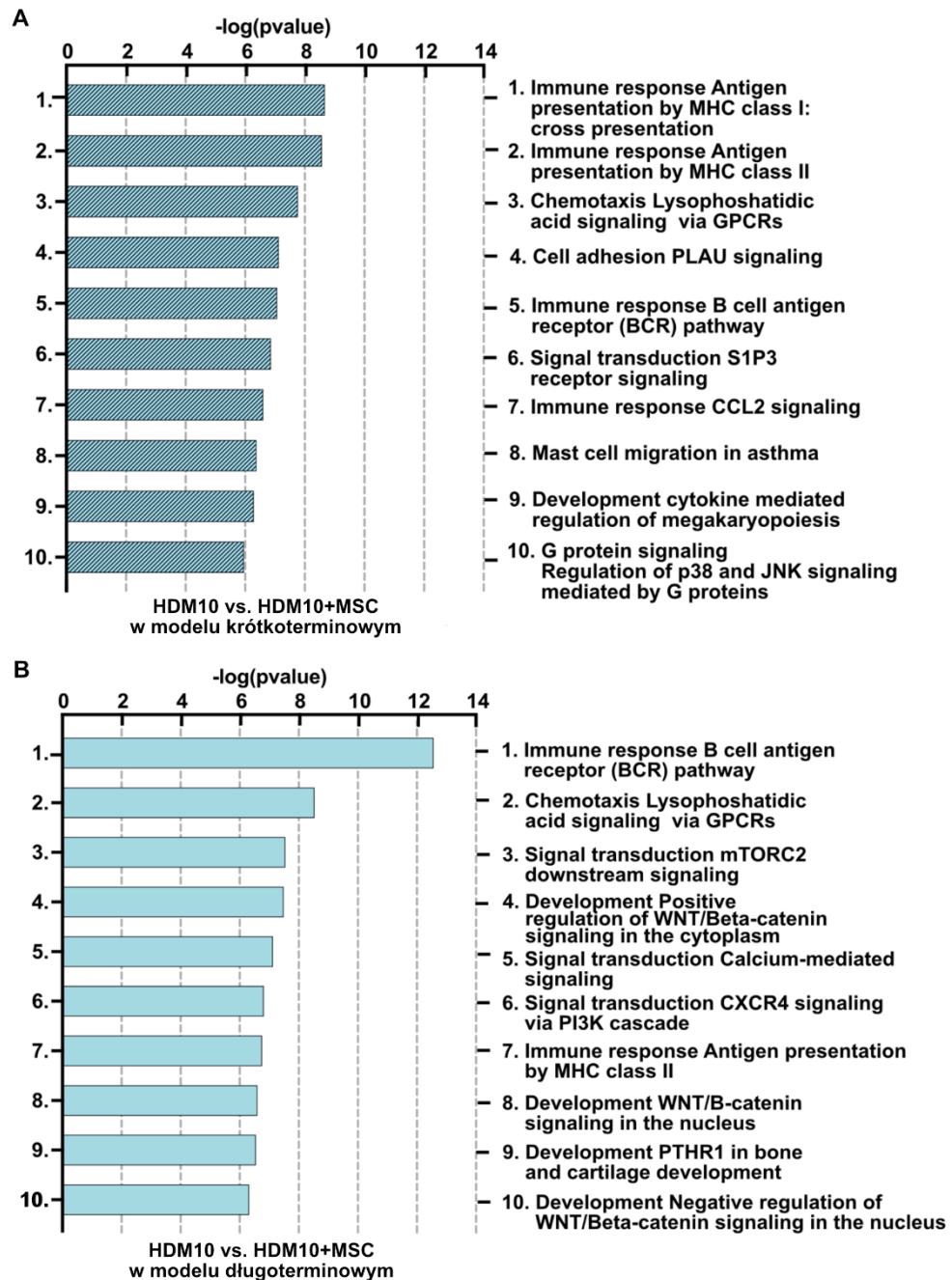
o zróżnicowanej ekspresji są ze sobą powiązane pod względem funkcjonalnym, jakie funkcje biologiczne kontrolują oraz w jaki sposób podlegają wzajemnym interakcją.

W pierwszym etapie analizy oceniłam czy zmiany w profilu transkryptomycznym płuc w zapaleniu indukowanym ekstraktem HDM odpowiadają charakterystycznym cechom dla zapalenia mieszanego (eozynofilowo/neutrofilowego) obserwowanego u ludzi. Analiza klastrów genowych związanych z zapaleniem dolnych dróg oddechowych wykazała deregulację licznych genów po indukcji zapalenia (Rycina 9A-L). Zmiany obejmowały między innymi podwyższenie ekspresji genów związanych z odpowiedzią zależną od limfocytów T subpopulacji Th1 (Rycina 9A), Th2 (Rycina 9B), Th17 (Rycina 9C); różnicowaniem limfocytów w kierunku Treg (Rycina 9D); proliferacją limfocytów (Rycina 9E); zapaleniem układu oddechowego (Rycina 9F); migracją leukocytów (Rycina 9G); rekrutacją neutrofilów (Rycina 9H); rekrutacją eozynofilów (Rycina 9I); aktywacją mediatorów lipidowych (Rycina 9J); ekspresją białek ścisłych połączeń komórkowych (*ang. tight junctions*, TJs, Rycina 9K) oraz produkcją mucyn (Rycina 9L).



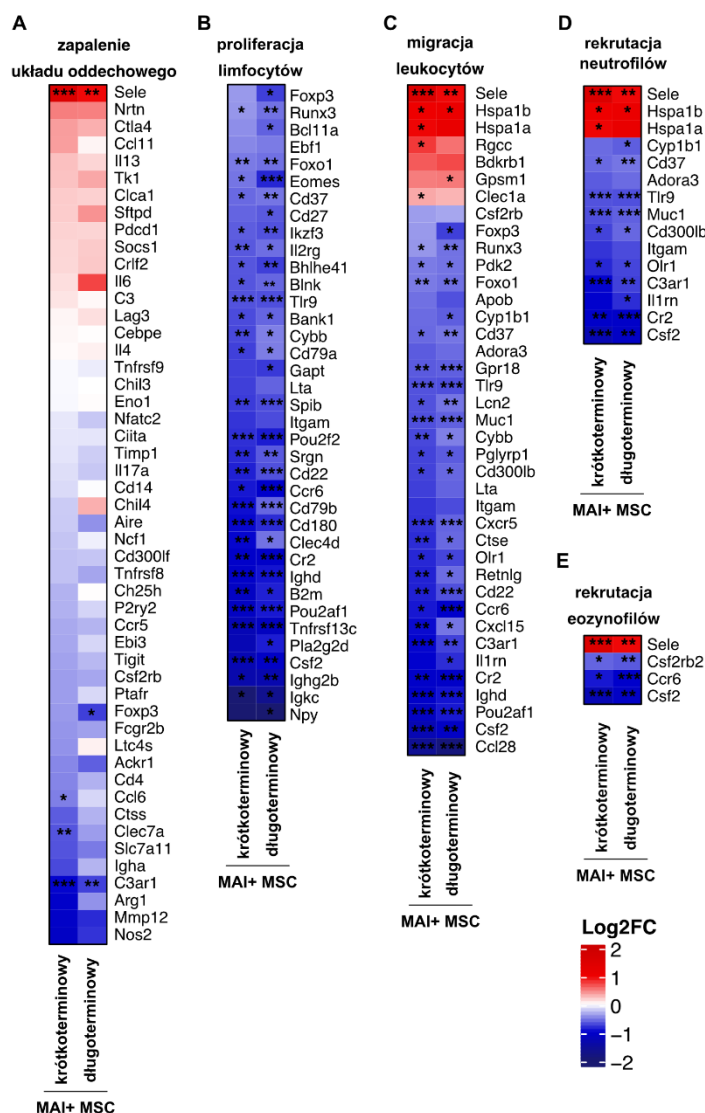
Rycina 9. Zmiany w ekspresji genów związanych z **A.** Odpowiedzią Th1 zależną; **B.** odpowiedzią Th2 zależną; **C.** odpowiedzią Th17 zależną; **D.** różnicowaniem w kierunku Treg; **E.** proliferacją limfocytów; **F.** zapaleniem układu oddechowego; **G.** migracją leukocytów; **H.** rekrutacją neutrofilów; **I.** rekrutacją eozynofili; **J.** eikozanoidami i mediatorami lipidowymi; **K.** białkami ścisłych połączeń komórkowych (*tight junctions*) oraz **L.** mucynami w eksperymentalnym modelu astmy. Analiza została przeprowadzona z użyciem narzędzia Mouse Genome Informatics (MGI v.6.17) Gene Ontology Browser; http://www.informatics.jax.org/vocab/gene_ontology/; dostęp 16 maja 2022). Analizę statystyczną wykonano z użyciem testu Wald'a z poprawką Benjamini-Hochberg'a; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

W kolejnym etapie analizy przeprowadziłam ocenę zmian w regulacji ścieżek sygnałowych po podaniu MSC. Uzyskane wyniki wskazują, iż, podanie MSC w wykorzystywanym eksperymentalnym modelu astmy prowadzi do obniżenia ekspresji genów w szlakach sygnałowych związanych głównie z odpowiedzią immunologiczną (Rycina 10A, B). Wyniki analiz zaprezentowanych na Rycinie 10A i 10B przedstawiają 10 najbardziej zmienionych ścieżek sygnałowych po podaniu MSC. Warto podkreślić, iż modelowanie funkcjonalne przeprowadzone z wykorzystaniem narzędzi MetaCore wskazało, że wszystkie poniższe ścieżki sygnalizacyjne są potencjalnie zahamowane/obniżone (Rycina 10A, 10B). W obu analizowanych modelach wskazano na obniżenie prezentacji antygeny prowadzonej w kontekście cząsteczki MHC klasy II; ograniczenie chemotaksji zależnej od receptorów sprzężonych z białkiem G; oraz obniżenie sygnalizacji związanej z aktywnością receptorów limfocytów B (*ang. B cell receptor*; BCR) (Rycina 10A, 10B). Dodatkowo, w modelu krótkoterminowym zaobserwowałam obniżenie ekspresji genów związanych z sygnalizacją zależną od S1P3 (sifngozyno 1-fosforanu 3); odpowiedzią immunologiczną zależną od CCL2 oraz migracją komórek tucznych (Rycina 10A). W modelu długoterminowym wyniki wskazują na potencjalne ograniczenie sygnalizacji zależnej od CXCR4 i kaskady PI3K oraz mTORC2 (Rycina 10B).



Rycina 10. Ocena wpływu podania MSC na regulację szlaków sygnałowych w **A.** modelu krótkoterminowym oraz **B.** długoterminowych w eksperymentalnym modelu astmy. Do analiz przeprowadzonych programie MetaCore włączono jedynie DEG zidentyfikowane na podstawie $|\text{Log}_2\text{FoldChange}| > 0,5$ i skorygowanej wartości p value $< 0,1$. Ponadto, nałożone zostały filtry umożliwiające zawężenie analiz wyłącznie do układu oddechowego. Analiza funkcjonalna w programie MetaCore wskazała, iż aktywacja wszystkich zaprezentowanych szlaków sygnalizacyjnych jest prawdopodobnie obniżona.

Bazując na wynikach analiz szlaków sygnałowych uzyskanych w programie MetaCore, oceniłam ekspresję genów związanych z procesami chemotaksji, migracji i rekrutacji komórek układu immunologicznego. Podanie MSC powodowało istotnie statystycznie obniżenie ekspresji szeregu genów zgrupowanych w klastrach związanych z zapaleniem układu oddechowego (Rycina 11A), proliferacją limfocytów (Rycina 11B), migracją leukocytów (Rycina 11C), rekrutacją neutrofilów (Rycina 11D) oraz rekrutacją eozynofiliów (Rycina 11E). Wyniki analiz transkryptomicznych wskazują, iż MSC mogą regulować procesy chemotaksji, migracji i rekrutacji komórek układu immunologicznego w zapaleniu dróg oddechowych w eksperymentalnym modelu astmy (Rycina 10 i 11).



Rycina 11. Zmiany w ekspresji genów związanych z **A.** zapaleniem układu oddechowego; **B.** proliferacją limfocytów; **C.** migracją leukocytów; **D.** rekrutacją neutrofilów oraz **E.** rekrutacją eozynofiliów po podaniu MSC w modelu krótko- i długoterminowym. Analiza została przeprowadzona z użyciem narzędzia Mouse Genome Informatics (MGI v.6.17) Gene Ontology Browser; http://www.informatics.jax.org/vocab/gen_e_ontology/; dostęp 16 maja 2022). Analizę statystyczną wykonano z użyciem testu Wald'a z poprawką Benjamini-Hochberg'a; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

VIII) DYSKUSJA

Pomimo znacznego postępu w zrozumieniu biologii MSC i ich potencjału terapeutycznego, metody leczenia chorób układu oddechowego wykorzystujące te komórki nie są rutynowo stosowane [17, 96-98]. Początkowo uważano, że MSC mogą integrować się z drogami oddechowymi [99]. Obecnie stało się jasne, że potencjał terapeutyczny MSC jest bardziej związany z ich funkcjami immunomodulującymi wywieranymi głównie przez efekty parakryne, jak i w mniejszym stopniu bezpośrednie interakcje komórka-komórka [17, 19]. Ponadto, nadal nierozwiązane pozostają kwestie bezpieczeństwa stosowania MSC w obrębie dróg oddechowych dotyczące m.in. ich stabilności, długoterminowych skutków stosowania oraz ich losu po podaniu [9, 100]. Wszystkie te niejasności znacznie opóźniają wdrożenie terapii wykorzystujących MSC w leczeniu przewlekłych chorób dróg oddechowych, takich jak ciężka astma.

W niniejszej rozprawie zaprezentowałam krótkoterminowe i długoterminowe skutki podawania MSC pochodzących z ludzkiej tkanki tłuszczowej na zdrowe płuca myszy (bez stanu zapalnego). Wykazałam zwiększony odsetek limfocytów T pomocniczych wytwarzających IFN γ i jednocześnie zmniejszenie ekspresji białek tworzących ścisłe połączenia nabłonka płucnego, a mianowicie okludyny i kładyny 3, jako długotrwały efekt podawania MSCs. Aby lepiej zrozumieć efekty jakie wywierają MSC w płucach niezmiennych chorobowo oceniłam profil transkrypcyjny. Uzyskane wyniki wskazują na zaburzenia związane z utrzymaniem równowagi redoks; aktywacją szlaków sygnalizacji w hipoksji; oraz aktywację funkcji fagocytarnej makrofagów.

W kolejnej części mojej pracy postanowiłam ocenić krótkoterminowe i długoterminowe efekty podawania MSC w środowisku zapalnym płuca, z wyindukowanym zapaleniem mieszanym eozynofilowo-neutrofilowym. Podczas prowadzonych badań zaobserwowałam zmniejszenie nacieku zapalnego w płucach po podaniu MSC. Dodatkowo, odnotowałam

obniżenie ilości produkowanych mucyn jako krótkotrwały efekt podania MSC. Co ciekawe, przez nosowe podanie MSC nie powodowało zmian w kompozycji limfocytów T efektorowych oraz cytokin prozapalnych w BALF. Wyjątek stanowiła IL-5 oraz IL-17A, które wzrastały po podaniu MSC, a następnie spadały do poziomu obserwowanego w płucach z zapaleniem. Pomimo braku bezpośredniego efektu obniżenia ilości cytokin prozapalnych oraz komórek je produkujących, uzyskane wyniki wskazują jednoznacznie na duży potencjał terapeutyczny MSC izolowanych z ludzkiej tkanki tłuszczowej. Dlatego, w celu lepszego zrozumienia przyczyn zmniejszenia nacieku zapalnego w płucach po podaniu MSC, przeprowadziłam analizę transkryptomyczną. Wykazałam, że podanie MSC powoduje obniżenie ekspresji genów związanych z m.in. prezentacją antygeny, chemotaksją leukocytów (również eozynofiliów oraz neutrofilów), proliferacją limfocytów oraz sygnalizacją BCR, a więc związane jest z działaniem na komponenty kształtujące odporność adaptacyjną układu immunologicznego.

Wyniki związane z oceną bezpieczeństwa stosowania MSC oraz sposobu w jakim komórki te wpływają na mikrośrodowisko płuc nieobjęte procesem zapalnym zostały przedyskutowane w manuskrypcie opublikowanym w czasopiśmie *Frontiers in Immunology* stanowiącej integralną część niniejszej dysertacji [101]. Dlatego, aby nie powielać informacji tam zawartych, w tym rozdziale przedyskutuje wyniki uzyskane podczas oceny wpływu MSC na kształt mikrośrodowiska płuc z zapaleniem eozynofilowo/neutrofilowym.

Jak już wspomniano, korzystne efekty stosowania MSC w kontroli zapalenia dolnych dróg oddechowych zostały potwierdzone w licznych badaniach przedklinicznych. Badania te w przeważającej większości wykorzystujących model zapalenia alergicznego indukowanego białkiem jaja kurzego (Ova-Alum) [75, 76, 80, 84, 86, 87]. W badaniach tych wykorzystywano zarówno ludzkie, jak również mysie MSC izolowane najczęściej ze szpiku kostnego. Co ciekawe, korzystne efekty obserwowane były zarówno po zastosowaniu komórek w modelu homotransplantacji jak i ksenotransplantacji [74, 75, 77, 80, 81, 85, 86].

Podobnie, różne ścieżki podania MSC (przez nosowa, dożylna, dotchawicza) nie wpływały na efekt terapeutyczny, a miały znaczenie jedynie co do długości przebywania MSC w płucach, a więc długości trwania efektu terapeutycznego [75, 76, 102]. Biorąc pod uwagę aplikacyjny charakter prowadzonych przeze mnie badań i chęć zrozumienia aktywności ludzkich MSC w badaniach własnych postanowiłam wykorzystać model przez nosowej ksenotransplantacji komórek MSC izolowanych z ludzkiej tkanki tłuszczowej. Warto zauważyć, że efekt terapeutyczny MSC izolowanych z tkanki tłuszczowej usuniętej podczas zabiegu plastyki brzucha nie był analizowany w kontekście przydatności w leczeniu stanów zapalnych płuc.

Powszechnie wiadomo, że zapalenie dolnych dróg oddechowych po prowokacji OVA zachodzi z przewagą nacieku eozynofilowego (neutrofile są nieliczne, jeśli w ogóle możliwe do wykrycia), aktywacją limfocytów T subpopulacji Th2 (bez udziału subpopulacji Th1 oraz Th17), aktywacją komórek tucznych, podwyższonym dojrzewaniem limfocytów B oraz produkcją dużych ilości przeciwciał klasy IgE (w tym specyficznych dla OVA) [76, 81, 85, 103]. Zastosowanie MSC w tym modelu, w dużym uproszczeniu, powodowało obniżenie odpowiedzi związanej z aktywnością limfocytów Th2, co w konsekwencji prowadziło do zmniejszenia stężenia cytokin typu 2 (IL-4, IL-5 i IL-13) i powodowało obniżenie aktywacji limfocytów B oraz spadek produkcji IgE [74, 77, 81, 84]. Obserwowano również podwyższenie ilości silnie immunosupresyjnych limfocytów T regulatorowych, a także alternatywnie aktywowanych makrofagów M2 [74, 80, 87]. Podwyższona liczebność obu wyżej wymienionych populacji komórek, które zdolne są do produkcji dużych ilości IL-10 powodowała wzrost stężenia tej cytokiny w BALF [4, 75, 80]. Wyniki te pozostają częściowo w sprzeczności z obserwacjami przeprowadzonymi w trakcie realizacji mojego projektu doktoranckiego.

Warto podkreślić, że wykorzystanie modelu astmy alergicznej wydają się mieć mniejsze przełożenie aplikacyjne, gdyż jak już zaznaczyłam we wstępie astma alergiczna oraz Th2

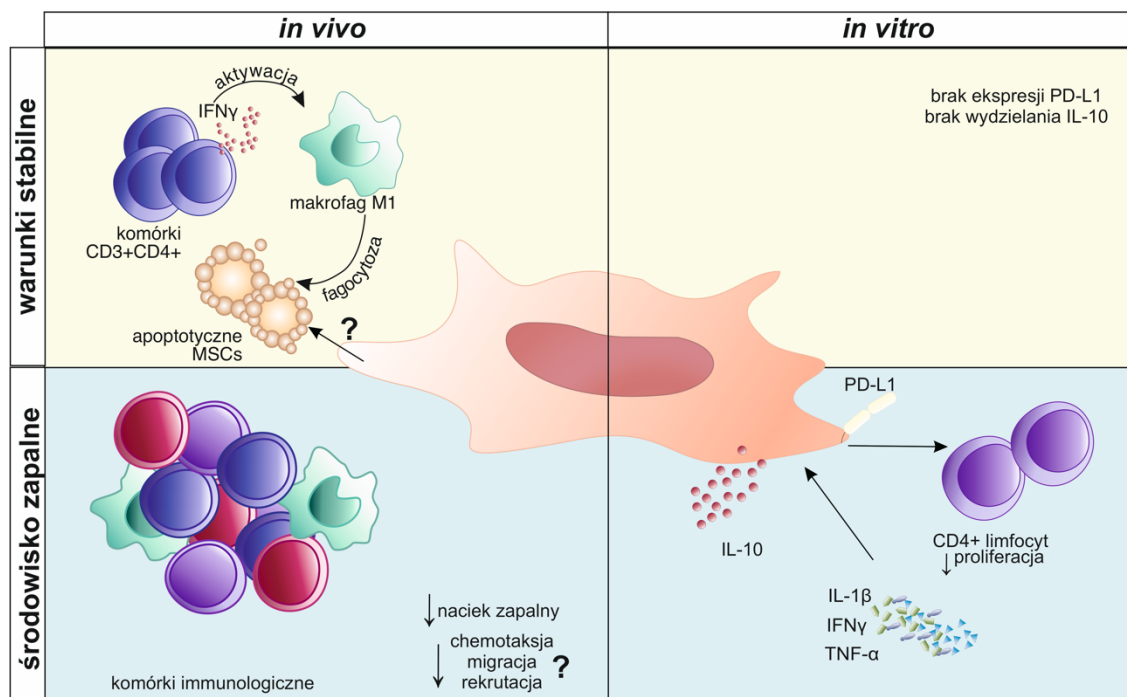
zależna jest dobrze kontrolowana przez dostępną terapię konwencjonalną i biologiczną [69, 72]. Dlatego, w badaniach własnych wykorzystałam eksperymentalny model astmy indukowanej niskimi stężeniami ekstraktu HDM. Model ten charakteryzuje się zapaleniem mieszanym (eozynofilowo-neutrofilowym), który w dość dobrym stopniu odwzorowuje zapalenie tego typu u ludzi [91]. Stan zapalny cechuje się w tym przypadku obecnością zarówno eozynofilów oraz neutrofilów, a także limfocytów T subpopulacji Th2, Th1 oraz Th17. Zgodnie z moją najlepszą wiedzą użyty w badaniu model nie był do tej pory wykorzystywany do oceny skuteczności działania MSC [91, 104]. W innych wykorzystywanych modelach indukowanych HDM lub jego głównymi alergenami wykorzystywano podobnie jak w modelu OVA-Alum aktywację obwodową w obecności adiuwantu, a następnie krótkotrwałą przez nosową indukcję alergenem co skutkowało wywołaniem zapalenia Th2 zależnego o cechach podobnych do wcześniej diskutowanego modelu. Podanie MSC w takich warunkach, obniżało naciek leukocytny w płucach, poprawiało ich funkcję oddechową, zmniejszało reaktywność dróg oddechowych, hamowało przerost komórek kubkowych i wydzielanie śluzu, obniżało również liczbę limfocytów dróg oddechowych, eozynofilów i monocytów w płucach oraz BAL [75, 77, 78, 80, 84, 88, 105, 106]. W badaniach tych nie analizowano natomiast kompozycji komórek efektorowych.

Należy pamiętać, że funkcje przeciwzapalne MSC indukowane są przez mediatory stanu zapalnego. Dlatego, różnice w profilu zapalnym w obrębie płuc obserwowane we wcześniej wykorzystywanych modelach (Th2 zależnych) oraz badaniach własnych mogą tłumaczyć różne mechanizmy działania MSC [107-115]. Zastanawiające jest jednak, dlaczego widoczne w barwieniu histochemicznym obniżenie nacieku leukocytnego dolnych dróg oddechowych nie powodowało spadku odsetka różnych populacji zapalnych limfocytów T efektorowych oraz poziomu cytokin prozapalnych w BALF. Z drugiej strony, brak zmian w odsetku limfocytów T efektorowych nie musi oznaczać spadku ich ilości względem masy

izolowanej tkanki i rzeczywiście ilość komórek izolowanych z płuc po podaniu MSC była w sposób istotny niższa (dane nie zaprezentowane). Biorąc pod uwagę wyniki analiz transkryptomicznych, w szczególności dotyczących poziomu ekspresji czynników chemotaktycznych można założyć, że podanie MSC w modelu astmy o mieszanym endotypie powoduje zmniejszenie migracji komórek zapalnych nie powodując zmian w kompozycji limfocytów T efektorowych w obrębie dolnych dróg oddechowych. Pamiętać należy również, że MSC mogą regulować nieswoistą odpowiedź immunologiczną włączając w to APC [4, 21, 45]. APC mają zdolność kształtowania odporności adaptacyjnej poprzez jej polaryzację na drodze zależnej od molekuł kostymulacyjnych stanowiących drugi sygnał aktywacji limfocytów [90, 116, 117]. W zaprezentowanych analizach transkryptomicznych zaobserwowałam obniżenie ekspresji genów związanych z prezentacją antygenów oraz proliferacją limfocytów co może wskazywać na obniżenie aktywności APC. Zaobserwowany zatem brak różnic w kompozycji limfocytów T efektorowych dolnych dróg oddechowych może wynikać ze zbyt krótkiego czasu potrzebnego do wyidukowania właściwości regulatorowych. Konieczne są jednak dalsze badania, które pozwolą lepiej zrozumieć wpływ podawania MSC na fenotyp i funkcję komórek należących do odpowiedzi nieswoistej w tym APC, w zastosowanym modelu.

Reasumując, wyniki moich badań potwierdzają, że MSC pochodzące z ludzkiej tkanki tłuszczowej, posiadają charakterystyczne cechy fenotypowe dla tych komórek oraz wykazują właściwości immunosupresyjne w środowisku prozapalnym. Przez nosowe podanie MSC do niezmiętej zapalnie tkanki płucnej nie powoduje widocznych zmian w obrazie histopatologicznym. Jednakże zaobserwowano zmiany w profilu transkryptomicznym płuc, sugerujące, iż MSC po transferze ulegają apoptozie, a następnie są usuwane przez fagocyty biorcy. Proces ten związany jest z powstaniem zapalenia o niskim nasileniu w obrębie tkanki płucnej. Podanie MSC w eksperymentalnym modelu astmy indukowanej ekstraktem HDM

ogranicza zapalenie dróg oddechowych, a zmiany te wydają się być zależne od regulacji procesów chemotaksji i migracji leukocytów. Podsumowanie wyników przeprowadzonych analiz zaprezentowano graficznie na Rycinie 12.



Rycina 12. Graficzne podsumowanie uzyskanych wyników i proponowanych na ich podstawie hipotez. Immunosupresyjność MSC wydaje się nie być cechą konstytutywną, ale aktywowaną w środowisku prozapalnym, zarówno w warunkach *in vivo* i *in vitro*. Wyniki mysiego eksperymentu doświadczalnego sugerują, iż MSC ulegają apoptozie, a następnie są usuwane przez makrofagi biorcy. Aktywacja przez cytokiny prozapalne zwiększa ekspresję PD-L1 i wydzielanie IL-10, ponadto MSC hamują proliferację limfocytów (warunki *in vitro*). Podanie MSC myszom z zapaleniem dróg oddechowych indukowanym ekstraktem HDM (środowisko zapalne, *in vivo*) powodowało ograniczenie zapalenia i prawdopodobną regulację procesów związanych z chemotaksją, migracją i rekrutacją komórek immunologicznych. IFN γ -interferon gamma; IL-1 β - interleukina 1 beta, TNF α - czynnik martwicy nowotworu alfa; IL-10-interleukina 10; PD-L1- ligand programowanej śmierci komórkowej 1; MSCs- mezenchymalne komórki macierzyste.

IX) WNIOSKI

1. Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z ludzkiej tkanki tłuszczowej usuniętej podczas zabiegu abdominoplastyki posiadają charakterystyczne cechy fenotypowe, różnicują się do komórek linii mezodermalnej oraz wykazują właściwości immunosupresyjne po stymulacji czynnikami zapalnymi.
2. Podanie mezenchymalnych komórek macierzystych do niezmienionej zapalnie tkanki płucnej myszy indukuje stanu zapalny niskiego nasilenia, który związany jest z usuwaniem apoptotycznych komórek przez fagocyty biorcy. Dlatego, przez nosowe podanie mezenchymalnych komórek macierzystych może być rozpatrywane jako bezpieczne.
3. Przez nosowe podanie mezenchymalnych komórek macierzystych ogranicza zapalenie dolnych dróg oddechowych w eksperymentalnym modelu astmy o endotypie mieszanym.
4. Immunosupresyjne efekty działania mezenchymalnych komórek macierzystych w zastosowanym modelu zależą od regulacji procesów chemotaksji, migracji i rekrutacji komórek immunologicznych.
5. Wykorzystanie MSC pochodzących z tkanki tłuszczowej może być efektywne w leczeniu astmy o endotypie mieszanym.

X) STRESZCZENIE POLSKIE

Opracowanie terapii opartej o wykorzystanie mezenchymalnych komórek macierzystych (*ang. mesenchymal stem cells, MSC*) wydaje się być obiecującą strategią w przypadku suboptymalnie kontrolowanych, przewlekłych chorób zapalnych dróg oddechowych, w tym również astmy. Dotychczasowe badania przedkliniczne potwierdziły, iż MSC mogą ograniczać zapalenie dolnych dróg oddechowych, jednakże mechanizm leżący u podstaw tych zmian nie jest wciąż wystarczająco poznany. Niedostateczna wiedza w zakresie procesów regulujących zapalenie dróg oddechowych po podaniu MSC, jak również ich stabilności i długoterminowych efektów ich działania utrudniają optymalizację efektywnej terapii komórkowej.

W związku z powyższym w niniejszym projekcie zbadano wpływ podania MSC pochodzących z ludzkiej tkanki tłuszczowej na 1) na niezmienną zapalnie tkankę płucną oraz 2) rozwój zapalenia dolnych dróg oddechowych w eksperymentalnym modelu astmy indukowanym ekstraktem roztocza kurzu domowego (*ang. house dust mite, HDM*).

MSC zostały wyizolowane z tkanki tłuszczowej pobranej od pacjentów po operacji bariatrycznej. Charakterystyczny fenotyp, multipotencjalność oraz właściwości immunosupresyjne MSC zostały potwierdzone w warunkach *in vitro* przed rozpoczęciem badań z wykorzystaniem mysich modeli doświadczalnych. W eksperymencie wykorzystano 25 myszy, samic szczepu C57BL6/cmdb w wieku 6-8 tygodni. Celem oceny krótko- oraz długoterminowych efektów przez nosowego podawania MSC do niezmienną zapalenie tkanki płucnej, do badań włączono również myszy otrzymujące wyłącznie komórki. Zapalenie dolnych dróg oddechowych zostało wyindukowane poprzez stymulację ekstraktem HDM w dawce 10µg przez pięć kolejnych dni w każdym z dwóch tygodni. Dodatkowo, dwie grupy zwierząt z zapaleniem dróg oddechowych otrzymywały preparat MSC w 13 i 6 dniu eksperymentu celem oceny krótko- i długoterminowych efektów działania.

Kontrolę w niniejszych doświadczeniach stanowiły zwierzęta otrzymujące jako jedyny rozwór soli fizjologicznej. Wszystkie myszy uśmiercono w 15 dniu eksperymentu. Celem analizy wpływu podania MSC, oceniono histopatologię płuca, integralność bariery epitelialnej, odsetki limfocytów T efektorowych, zmiany w profilach transkryptomycznych oraz zmiany w stężeniach cytokin w popłuczynach oskrzelowo pęcherzykowych.

Przez nosowe podanie MSC do myszy ze zdrową tkanką płucną nie powodowało widocznej infiltracji komórek immunologicznych oraz nadprodukcji śluzu. Jednakże, zaobserwowano podwyższenie odsetka populacji limfocytów T efektorowych produkujących IFN γ , podczas gdy liczebności subpopulacji komórek T wydzielających IL-4, IL-17 i IL-10 pozostawały bez zmian. Ponadto, stwierdzono obniżenie ekspresji białek ścisłych połączeń komórkowych w barierze epitelialnej, a mianowicie Klaudyny 3 i Okludyny przy niezmienionej ekspresji ZO-1. Analizy transkryptomiczne wykazały zmiany w ekspresji genów powiązanych z regulacją procesów związanych z aktywacją makrofagów, fagocytozą i stresem oksydacyjnym. Ponadto, porównawcze analizy transkryptomiczne wykazały, iż ekspresja znacznej większości genów związanych z odpowiedzią immunologiczną ulega obniżeniu w modelu długoterminowym względem modelu krótkoterminowego.

Natomiast, podanie MSC w eksperymentalnym modelu astmy indukowanej ekstraktem HDM ograniczało zapalenie dróg oddechowych oraz produkcję śluzu. Niestety, nie zaobserwowano wyraźnych zmian w odsetkach subpopulacji limfocytów T efektorowych oraz cytokin związanych z odpowiedzią T zależną. Jednakże, odnotowano różnice w profilach transkryptomycznych po podaniu MSC w obu modelach. Ocena regulacji szlaków sygnałowych w narzędziu MetaCore wykazała obniżenie regulacji sygnalizacji zależnej od CCL2, S1P3 i CXCR4. Bardziej szczegółowe analizy transkryptomiczne dowiodły, iż znaczna większość genów o zróżnicowanej ekspresji jest związana z procesami chemotaksji, proliferacji limfocytów i migracji leukocytów.

Wyniki niniejszych badań wskazują MSC jako potencjalnie bezpieczną strategię terapeutyczną umożliwiającą ograniczenie zapalenia dolnych dróg oddechowych poprzez regulację procesów chemotaksji, migracji i rekrutacji komórek immunologicznych. Ponadto, opisane dane sugerują, iż MSC w stałych warunkach środowiska (niezapalnych) ulegają apoptozie i są usuwane przez fagocyty biorcy.

XI) STRESZCZENIE ANGLOJEZYCZNE

The implementation of mesenchymal stem cell-based (MSCs) therapy seems to be a promising strategy in suboptimally controlled chronic inflammatory diseases of the respiratory system, including asthma. Previous preclinical studies have confirmed, that MSC may limit airway inflammation, however, the mechanism underlying those changes remains elusive. Insufficient knowledge regarding MSC-mediated processes of airway inflammation regulation, as well as their stability and long-term effect, restrict optimization of effective stem cell-based therapy.

Therefore, here I aimed to investigate the influence of adipose tissue-derived MSCs on 1) non-inflamed lung tissue and 2) airway inflammation development in a house dust mite (HDM)-induced experimental asthma model.

MSCs were isolated from adipose tissue collected from patients after bariatric surgery. Their characteristic phenotype, multipotency, and immunosuppressive properties *in vitro* were confirmed prior to mice model implementation. Female, 6-8 weeks old, C57BL6/cmdb mice were used in the experiment. To assess the short- and long-term effects of MSC on non-inflamed lung tissue, two groups treated only with cells were included. To induce airway inflammation, mice were challenged with 10 μ g HDM extract for 5 days each of two weeks. Moreover, to investigate the short- and long-term effects of MSCs administration on airway inflammation, two mice groups were administrated with cells on the 13th and 6th days of the experiment, respectively. Mice treated with saline were included as a control. All animals were sacrificed on the 15th day of the experiment. Histopathology staining, epithelial barrier integrity, frequency of T cell effectors, transcriptomic profile changes, and cytokines levels in BAL were assessed.

MSCs administration to non-inflamed lung tissue did not cause immune cell infiltration and mucus overproduction. However, I found an increase in the frequency of IFN-producing T

cells, while IL-4, IL-17, and IL-10 positive T cell populations were not changed. Moreover, I found a decrease in epithelial tight junction proteins expression, namely Occludin and Claudin 3, while ZO-1 was not affected. Transcriptomic analysis revealed the changes in the expression of genes related to macrophage activation, phagocytosis, and oxidative stress. Moreover, comparative transcriptome analysis showed that the expression of most genes associated with immune response is decreased in the long-term model in comparison to the short-term.

On the other hand, the administration of MSCs in an experimental asthma model leads to the limitation of airway inflammation and mucus production. Unfortunately, I did not observe substantial changes in the frequency of T cell effectors and T cell-related cytokines. However, I noted differences in transcriptomic profiles in both models. Transcriptomic analysis using Metacore revealed the downregulation in signaling pathways related to CCL2, S1P3, and CXCR4. More specifically, most of the differentially regulated genes in MSC-treated groups were clustered in terms related to chemotaxis, lymphocyte proliferation, and leukocyte migration.

In summary, the results indicate that MSC may be considered a safe strategy for limiting airway inflammation via regulation of chemotaxis, migration, and recruitment of immune cells. Moreover, our data suggest that MSC in steady state conditions undergo apoptosis and are cleared by host phagocytes.

XII) BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Uccelli, L. Moretta, and V. Pistoia, "Mesenchymal stem cells in health and disease," (in eng), *Nat Rev Immunol*, vol. 8, no. 9, pp. 726-36, Sep 2008, doi: 10.1038/nri2395.
- [2] A. I. Caplan, "Mesenchymal stem cells," (in eng), *J Orthop Res*, vol. 9, no. 5, pp. 641-50, Sep 1991, doi: 10.1002/jor.1100090504.
- [3] B. Puissant *et al.*, "Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells," (in eng), *Br J Haematol*, vol. 129, no. 1, pp. 118-29, Apr 2005, doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05409.x.
- [4] R. Dai, J. Liu, S. Cai, C. Zheng, and X. Zhou, "Delivery of adipose-derived mesenchymal stem cells attenuates airway responsiveness and inflammation in a mouse model of ovalbumin-induced asthma," (in eng), *Am J Transl Res*, vol. 9, no. 5, pp. 2421-2428, 2017.
- [5] H. K. Park *et al.*, "Adipose-derived stromal cells inhibit allergic airway inflammation in mice," (in eng), *Stem Cells Dev*, vol. 19, no. 11, pp. 1811-8, Nov 2010, doi: 10.1089/scd.2009.0513.
- [6] T. Du *et al.*, "Human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells reduce renal fibrosis through induction of native and foreign hepatocyte growth factor synthesis in injured tubular epithelial cells," (in eng), *Stem Cell Res Ther*, vol. 4, no. 3, p. 59, Jun 2013, doi: 10.1186/scrt215.
- [7] K. H. Yoo *et al.*, "Comparison of immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from adult human tissues," (in eng), *Cell Immunol*, vol. 259, no. 2, pp. 150-6, 2009, doi: 10.1016/j.cellimm.2009.06.010.
- [8] Y. Deng *et al.*, "Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells Instruct Monocytes Towards an IL10-producing Phenotype by Secreting IL6 and HGF," (in eng), *Sci Rep*, vol. 6, p. 37566, 12 2016, doi: 10.1038/srep37566.
- [9] F. Meng *et al.*, "Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cell therapy in patients with COVID-19: a phase 1 clinical trial," (in eng), *Signal Transduct Target Ther*, vol. 5, no. 1, p. 172, 08 27 2020, doi: 10.1038/s41392-020-00286-5.
- [10] J. Savickiene *et al.*, "Human Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells from Second- and Third-Trimester Amniocentesis: Differentiation Potential, Molecular Signature,

- and Proteome Analysis," (in eng), *Stem Cells Int*, vol. 2015, p. 319238, 2015, doi: 10.1155/2015/319238.
- [11] M. G. Roubelakis *et al.*, "Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells," (in eng), *Stem Cells Dev*, vol. 16, no. 6, pp. 931-52, Dec 2007, doi: 10.1089/scd.2007.0036.
- [12] M. S. Tsai *et al.*, "Functional network analysis of the transcriptomes of mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid, amniotic membrane, cord blood, and bone marrow," (in eng), *Stem Cells*, vol. 25, no. 10, pp. 2511-23, Oct 2007, doi: 10.1634/stemcells.2007-0023.
- [13] S. Shi and S. Gronthos, "Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp," (in eng), *J Bone Miner Res*, vol. 18, no. 4, pp. 696-704, Apr 2003, doi: 10.1359/jbmr.2003.18.4.696.
- [14] S. J. Wang *et al.*, "Chondrogenic Potential of Peripheral Blood Derived Mesenchymal Stem Cells Seeded on Demineralized Cancellous Bone Scaffolds," (in eng), *Sci Rep*, vol. 6, p. 36400, 11 2016, doi: 10.1038/srep36400.
- [15] J. Xu *et al.*, "Effect of Bone Morphogenetic Protein 6 on Immunomodulatory Functions of Salivary Gland-Derived Mesenchymal Stem Cells in Sjögren's Syndrome," (in eng), *Stem Cells Dev*, vol. 27, no. 22, pp. 1540-1548, 11 2018, doi: 10.1089/scd.2017.0161.
- [16] E. B. de Sousa, P. L. Casado, V. Moura Neto, M. E. Duarte, and D. P. Aguiar, "Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: latest discoveries and therapeutic perspectives," (in eng), *Stem Cell Res Ther*, vol. 5, no. 5, p. 112, Oct 2014, doi: 10.1186/scrt501.
- [17] M. Tynecka, M. Moniuszko, and A. Eljaszewicz, "Old Friends with Unexploited Perspectives: Current Advances in Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies in Asthma," (in eng), *Stem Cell Rev Rep*, vol. 17, no. 4, pp. 1323-1342, Aug 2021, doi: 10.1007/s12015-021-10137-7.
- [18] C. Grégoire *et al.*, "Comparison of Mesenchymal Stromal Cells From Different Origins for the Treatment of Graft-vs.-Host-Disease in a Humanized Mouse Model," (in eng), *Front Immunol*, vol. 10, p. 619, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.00619.
- [19] N. C. Noronha *et al.*, "Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies," (in eng), *Stem Cell Res Ther*, vol. 10, no. 1, p. 131, 05 02 2019, doi: 10.1186/s13287-019-1224-y.

- [20] E. Redondo-Castro *et al.*, "Interleukin-1 primes human mesenchymal stem cells towards an anti-inflammatory and pro-trophic phenotype in vitro," (in eng), *Stem Cell Res Ther*, vol. 8, no. 1, p. 79, 04 2017, doi: 10.1186/s13287-017-0531-4.
- [21] D. Mougiakakos, R. Jitschin, C. C. Johansson, R. Okita, R. Kiessling, and K. Le Blanc, "The impact of inflammatory licensing on heme oxygenase-1-mediated induction of regulatory T cells by human mesenchymal stem cells," (in eng), *Blood*, vol. 117, no. 18, pp. 4826-35, May 2011, doi: 10.1182/blood-2010-12-324038.
- [22] H. Sheng *et al.*, "A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1," (in eng), *Cell Res*, vol. 18, no. 8, pp. 846-57, Aug 2008, doi: 10.1038/cr.2008.80.
- [23] F. Benvenuto *et al.*, "Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state," (in eng), *Stem Cells*, vol. 25, no. 7, pp. 1753-60, Jul 2007, doi: 10.1634/stemcells.2007-0068.
- [24] Y. Zhou, A. Day, S. Haykal, A. Keating, and T. K. Waddell, "Mesenchymal stromal cells augment CD4⁺ and CD8⁺ T-cell proliferation through a CCL2 pathway," (in eng), *Cytotherapy*, vol. 15, no. 10, pp. 1195-207, Oct 2013, doi: 10.1016/j.jcyt.2013.05.009.
- [25] P. Luz-Crawford *et al.*, "Mesenchymal stem cells generate a CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cell population during the differentiation process of Th1 and Th17 cells," (in eng), *Stem Cell Res Ther*, vol. 4, no. 3, p. 65, Jun 2013, doi: 10.1186/scrt216.
- [26] G. M. Spaggiari, A. Capobianco, H. Abdelrazik, F. Becchetti, M. C. Mingari, and L. Moretta, "Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2," (in eng), *Blood*, vol. 111, no. 3, pp. 1327-33, Feb 2008, doi: 10.1182/blood-2007-02-074997.
- [27] G. M. Spaggiari, A. Capobianco, S. Becchetti, M. C. Mingari, and L. Moretta, "Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation," (in eng), *Blood*, vol. 107, no. 4, pp. 1484-90, Feb 2006, doi: 10.1182/blood-2005-07-2775.
- [28] P. Luz-Crawford *et al.*, "Mesenchymal Stem Cell-Derived Interleukin 1 Receptor Antagonist Promotes Macrophage Polarization and Inhibits B Cell Differentiation," (in eng), *Stem Cells*, vol. 34, no. 2, pp. 483-92, Feb 2016, doi: 10.1002/stem.2254.

- [29] K. Ni *et al.*, "PD-1/PD-L1 Pathway Mediates the Alleviation of Pulmonary Fibrosis by Human Mesenchymal Stem Cells in Humanized Mice," (in eng), *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 58, no. 6, pp. 684-695, 06 2018, doi: 10.1165/rcmb.2017-0326OC.
- [30] W. B. Wang *et al.*, "Interleukin-25 Mediates Transcriptional Control of PD-L1 via STAT3 in Multipotent Human Mesenchymal Stromal Cells (hMSCs) to Suppress Th17 Responses," (in eng), *Stem Cell Reports*, vol. 5, no. 3, pp. 392-404, Sep 2015, doi: 10.1016/j.stemcr.2015.07.013.
- [31] D. Kehl *et al.*, "Proteomic analysis of human mesenchymal stromal cell secretomes: a systematic comparison of the angiogenic potential," (in eng), *NPJ Regen Med*, vol. 4, p. 8, 2019, doi: 10.1038/s41536-019-0070-y.
- [32] Y. Li *et al.*, "Cell-cell contact with proinflammatory macrophages enhances the immunotherapeutic effect of mesenchymal stem cells in two abortion models," (in eng), *Cell Mol Immunol*, vol. 16, no. 12, pp. 908-920, Dec 2019, doi: 10.1038/s41423-019-0204-6.
- [33] M. Krampera *et al.*, "Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells," (in eng), *Stem Cells*, vol. 24, no. 2, pp. 386-98, Feb 2006, doi: 10.1634/stemcells.2005-0008.
- [34] F. Gieseke, J. Böhringer, R. Bussolari, M. Dominici, R. Handgretinger, and I. Müller, "Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells," (in eng), *Blood*, vol. 116, no. 19, pp. 3770-9, Nov 2010, doi: 10.1182/blood-2010-02-270777.
- [35] R. Chinnadurai, I. B. Copland, S. R. Patel, and J. Galipeau, "IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN- γ -licensed human mesenchymal stromal cells," (in eng), *J Immunol*, vol. 192, no. 4, pp. 1491-501, Feb 2014, doi: 10.4049/jimmunol.1301828.
- [36] Q. H. Chen *et al.*, "Mesenchymal stem cells regulate the Th17/Treg cell balance partly through hepatocyte growth factor in vitro," (in eng), *Stem Cell Res Ther*, vol. 11, no. 1, p. 91, 02 2020, doi: 10.1186/s13287-020-01612-y.
- [37] A. K. Singh, P. Stock, and O. Akbari, "Role of PD-L1 and PD-L2 in allergic diseases and asthma," (in eng), *Allergy*, vol. 66, no. 2, pp. 155-62, Feb 2011, doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02458.x.
- [38] F. Schena *et al.*, "Interferon- γ -dependent inhibition of B cell activation by bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a murine model of systemic lupus erythematosus," (in eng), *Arthritis Rheum*, vol. 62, no. 9, pp. 2776-86, Sep 2010, doi: 10.1002/art.27560.

- [39] H. J. Lee, S. N. Kim, M. S. Jeon, T. Yi, and S. U. Song, "ICOSL expression in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes induction of regulatory T cells," (in eng), *Sci Rep*, vol. 7, p. 44486, 03 2017, doi: 10.1038/srep44486.
- [40] X. Fan *et al.*, "Mesenchymal stem cells regulate type 2 innate lymphoid cells via regulatory T cells through ICOS-ICOSL interaction," (in eng), *Stem Cells*, vol. 39, no. 7, pp. 975-987, 07 2021, doi: 10.1002/stem.3369.
- [41] K. Akiyama *et al.*, "Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis," (in eng), *Cell Stem Cell*, vol. 10, no. 5, pp. 544-55, May 04 2012, doi: 10.1016/j.stem.2012.03.007.
- [42] A. M. Vacaru, M. Dumitrescu, I. M. Fenyó, R. Ionita, A. V. Gafencu, and M. Simionescu, "Enhanced Suppression of Immune Cells In Vitro by MSC Overexpressing FasL," (in eng), *Int J Mol Sci*, vol. 22, no. 1, Dec 31 2020, doi: 10.3390/ijms22010348.
- [43] M. H. Abumaree *et al.*, "Human placental mesenchymal stem cells (pMSCs) play a role as immune suppressive cells by shifting macrophage differentiation from inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 macrophages," (in eng), *Stem Cell Rev Rep*, vol. 9, no. 5, pp. 620-41, Oct 2013, doi: 10.1007/s12015-013-9455-2.
- [44] F. Djouad *et al.*, "Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism," (in eng), *Stem Cells*, vol. 25, no. 8, pp. 2025-32, Aug 2007, doi: 10.1634/stemcells.2006-0548.
- [45] Y. P. Li *et al.*, "Human mesenchymal stem cells license adult CD34⁺ hemopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the Notch pathway," (in eng), *J Immunol*, vol. 180, no. 3, pp. 1598-608, Feb 2008, doi: 10.4049/jimmunol.180.3.1598.
- [46] M. R. Sgrignoli *et al.*, "Reduction in the inflammatory markers CD4, IL-1, IL-6 and TNF α in dogs with keratoconjunctivitis sicca treated topically with mesenchymal stem cells," (in eng), *Stem Cell Res*, vol. 39, p. 101525, 08 2019, doi: 10.1016/j.scr.2019.101525.
- [47] B. Shi *et al.*, "Mesenchymal stem cell transplantation ameliorates Sjögren's syndrome via suppressing IL-12 production by dendritic cells," (in eng), *Stem Cell Res Ther*, vol. 9, no. 1, p. 308, 11 2018, doi: 10.1186/s13287-018-1023-x.
- [48] D. Chatterjee *et al.*, "Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Utilize Activin-A to Suppress Interferon- γ Production by Natural Killer Cells," (in eng), *Front Immunol*, vol. 5, p. 662, 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00662.

- [49] J. Y. Lim *et al.*, "Enhanced immunoregulation of mesenchymal stem cells by IL-10-producing type 1 regulatory T cells in collagen-induced arthritis," (in eng), *Sci Rep*, vol. 6, p. 26851, 06 2016, doi: 10.1038/srep26851.
- [50] M. Z. Ratajczak and J. Ratajczak, "Extracellular microvesicles/exosomes: discovery, disbelief, acceptance, and the future?," (in eng), *Leukemia*, Sep 2020, doi: 10.1038/s41375-020-01041-z.
- [51] M. Z. Ratajczak *et al.*, "Pivotal role of paracrine effects in stem cell therapies in regenerative medicine: can we translate stem cell-secreted paracrine factors and microvesicles into better therapeutic strategies?," (in eng), *Leukemia*, vol. 26, no. 6, pp. 1166-73, Jun 2012, doi: 10.1038/leu.2011.389.
- [52] J. Ratajczak *et al.*, "Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery," (in eng), *Leukemia*, vol. 20, no. 5, pp. 847-56, May 2006, doi: 10.1038/sj.leu.2404132.
- [53] D. G. Phinney *et al.*, "Mesenchymal stem cells use extracellular vesicles to outsource mitophagy and shuttle microRNAs," (in eng), *Nat Commun*, vol. 6, p. 8472, Oct 2015, doi: 10.1038/ncomms9472.
- [54] H. S. Kim *et al.*, "Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells," (in eng), *J Proteome Res*, vol. 11, no. 2, pp. 839-49, Feb 2012, doi: 10.1021/pr200682z.
- [55] S. Aggarwal and M. F. Pittenger, "Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses," (in eng), *Blood*, vol. 105, no. 4, pp. 1815-22, Feb 2005, doi: 10.1182/blood-2004-04-1559.
- [56] M. Di Nicola *et al.*, "Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli," (in eng), *Blood*, vol. 99, no. 10, pp. 3838-43, May 2002, doi: 10.1182/blood.v99.10.3838.
- [57] P. Hwu, M. X. Du, R. Lapointe, M. Do, M. W. Taylor, and H. A. Young, "Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation," (in eng), *J Immunol*, vol. 164, no. 7, pp. 3596-9, Apr 2000, doi: 10.4049/jimmunol.164.7.3596.
- [58] M. T. Harting *et al.*, "Inflammation-Stimulated Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Attenuate Inflammation," (in eng), *Stem Cells*, vol. 36, no. 1, pp. 79-90, 01 2018, doi: 10.1002/stem.2730.

- [59] S. Wu, G. Q. Ju, T. Du, Y. J. Zhu, and G. H. Liu, "Microvesicles derived from human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells attenuate bladder tumor cell growth in vitro and in vivo," (in eng), *PLoS One*, vol. 8, no. 4, p. e61366, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0061366.
- [60] M. Di Trapani *et al.*, "Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions," (in eng), *Sci Rep*, vol. 6, p. 24120, Apr 2016, doi: 10.1038/srep24120.
- [61] B. N. Lambrecht and H. Hammad, "The immunology of asthma," (in eng), *Nat Immunol*, vol. 16, no. 1, pp. 45-56, Jan 2015, doi: 10.1038/ni.3049.
- [62] H. Hammad and B. N. Lambrecht, "Barrier Epithelial Cells and the Control of Type 2 Immunity," (in eng), *Immunity*, vol. 43, no. 1, pp. 29-40, Jul 2015, doi: 10.1016/j.immuni.2015.07.007.
- [63] K. Sugita *et al.*, "Type 2 innate lymphoid cells disrupt bronchial epithelial barrier integrity by targeting tight junctions through IL-13 in asthmatic patients," (in eng), *J Allergy Clin Immunol*, vol. 141, no. 1, pp. 300-310.e11, 01 2018, doi: 10.1016/j.jaci.2017.02.038.
- [64] Y. Chang *et al.*, "TH17 cytokines induce human airway smooth muscle cell migration," (in eng), *J Allergy Clin Immunol*, vol. 127, no. 4, pp. 1046-53.e1-2, Apr 2011, doi: 10.1016/j.jaci.2010.12.1117.
- [65] D. C. Newcomb and R. S. Peebles, "Th17-mediated inflammation in asthma," (in eng), *Curr Opin Immunol*, vol. 25, no. 6, pp. 755-60, Dec 2013, doi: 10.1016/j.coi.2013.08.002.
- [66] H. Wakashin *et al.*, "IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice," (in eng), *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 178, no. 10, pp. 1023-32, Nov 2008, doi: 10.1164/rccm.200801-086OC.
- [67] L. Cosmi, F. Liotta, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato, "Th17 cells: new players in asthma pathogenesis," (in eng), *Allergy*, vol. 66, no. 8, pp. 989-98, Aug 2011, doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02576.x.
- [68] J. Chesné, F. Braza, G. Mahay, S. Brouard, M. Aronica, and A. Magnan, "IL-17 in severe asthma. Where do we stand?," (in eng), *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 190, no. 10, pp. 1094-101, Nov 2014, doi: 10.1164/rccm.201405-0859PP.
- [69] C. A. Akdis, "Therapies for allergic inflammation: refining strategies to induce tolerance," (in eng), *Nat Med*, vol. 18, no. 5, pp. 736-49, May 2012, doi: 10.1038/nm.2754.

- [70] P. J. Barnes, "Molecular mechanisms and cellular effects of glucocorticosteroids," (in eng), *Immunol Allergy Clin North Am*, vol. 25, no. 3, pp. 451-68, Aug 2005, doi: 10.1016/j.iac.2005.05.003.
- [71] S. T. Holgate and R. Polosa, "Treatment strategies for allergy and asthma," (in eng), *Nat Rev Immunol*, vol. 8, no. 3, pp. 218-30, Mar 2008, doi: 10.1038/nri2262.
- [72] I. Agache *et al.*, "Efficacy and safety of treatment with biologicals (benralizumab, dupilumab and omalizumab) for severe allergic asthma: A systematic review for the EAACI Guidelines - recommendations on the use of biologicals in severe asthma," (in eng), *Allergy*, vol. 75, no. 5, pp. 1043-1057, 05 2020, doi: 10.1111/all.14235.
- [73] J. R. Castillo, S. P. Peters, and W. W. Busse, "Asthma Exacerbations: Pathogenesis, Prevention, and Treatment," (in eng), *J Allergy Clin Immunol Pract*, vol. 5, no. 4, pp. 918-927, 2017 Jul - Aug 2017, doi: 10.1016/j.jaip.2017.05.001.
- [74] K. Takeda *et al.*, "Mesenchymal Stem Cells Recruit CCR2," (in eng), *J Immunol*, vol. 200, no. 4, pp. 1261-1269, 02 2018, doi: 10.4049/jimmunol.1700562.
- [75] J. Z. Kitoko *et al.*, "Therapeutic administration of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells reduces airway inflammation without up-regulating Tregs in experimental asthma," (in eng), *Clin Exp Allergy*, vol. 48, no. 2, pp. 205-216, 02 2018, doi: 10.1111/cea.13048.
- [76] S. C. Abreu *et al.*, "Bone Marrow, Adipose, and Lung Tissue-Derived Murine Mesenchymal Stromal Cells Release Different Mediators and Differentially Affect Airway and Lung Parenchyma in Experimental Asthma," (in eng), *Stem Cells Transl Med*, vol. 6, no. 6, pp. 1557-1567, 06 2017, doi: 10.1002/sctm.16-0398.
- [77] F. Braza *et al.*, "Mesenchymal Stem Cells Induce Suppressive Macrophages Through Phagocytosis in a Mouse Model of Asthma," (in eng), *Stem Cells*, vol. 34, no. 7, pp. 1836-45, 07 2016, doi: 10.1002/stem.2344.
- [78] L. Mariñas-Pardo *et al.*, "Mesenchymal stem cells regulate airway contractile tissue remodeling in murine experimental asthma," (in eng), *Allergy*, vol. 69, no. 6, pp. 730-40, Jun 2014, doi: 10.1111/all.12392.
- [79] G. H. Hong *et al.*, "hMSCs suppress neutrophil-dominant airway inflammation in a murine model of asthma," (in eng), *Exp Mol Med*, vol. 49, no. 1, p. e288, 01 2017, doi: 10.1038/emm.2016.135.
- [80] H. Kavanagh and B. P. Mahon, "Allogeneic mesenchymal stem cells prevent allergic airway inflammation by inducing murine regulatory T cells," (in eng), *Allergy*, vol. 66, no. 4, pp. 523-31, Apr 2011, doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02509.x.

- [81] T. L. Bonfield, M. Koloze, D. P. Lennon, B. Zuchowski, S. E. Yang, and A. I. Caplan, "Human mesenchymal stem cells suppress chronic airway inflammation in the murine ovalbumin asthma model," (in eng), *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 299, no. 6, pp. L760-70, Dec 2010, doi: 10.1152/ajplung.00182.2009.
- [82] B. L. Yen, M. L. Yen, L. T. Wang, K. J. Liu, and H. K. Sytwu, "Current status of mesenchymal stem cell therapy for immune/inflammatory lung disorders: Gleaning insights for possible use in COVID-19," (in eng), *Stem Cells Transl Med*, Jun 2020, doi: 10.1002/sctm.20-0186.
- [83] S. Kapoor, S. A. Patel, S. Kartan, D. Axelrod, E. Capitle, and P. Rameshwar, "Tolerance-like mediated suppression by mesenchymal stem cells in patients with dust mite allergy-induced asthma," (in eng), *J Allergy Clin Immunol*, vol. 129, no. 4, pp. 1094-101, Apr 2012, doi: 10.1016/j.jaci.2011.10.048.
- [84] L. L. de Castro *et al.*, "Human adipose tissue mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles act differentially on lung mechanics and inflammation in experimental allergic asthma," (in eng), *Stem Cell Res Ther*, vol. 8, no. 1, p. 151, 06 2017, doi: 10.1186/s13287-017-0600-8.
- [85] K. M. Duong *et al.*, "Immunomodulation of airway epithelium cell activation by mesenchymal stromal cells ameliorates house dust mite-induced airway inflammation in mice," (in eng), *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 53, no. 5, pp. 615-24, Nov 2015, doi: 10.1165/rcmb.2014-0431OC.
- [86] L. J. Mathias *et al.*, "Alveolar macrophages are critical for the inhibition of allergic asthma by mesenchymal stromal cells," (in eng), *J Immunol*, vol. 191, no. 12, pp. 5914-24, Dec 2013, doi: 10.4049/jimmunol.1300667.
- [87] I. Ogulur *et al.*, "Suppressive effect of compact bone-derived mesenchymal stem cells on chronic airway remodeling in murine model of asthma," (in eng), *Int Immunopharmacol*, vol. 20, no. 1, pp. 101-9, May 2014, doi: 10.1016/j.intimp.2014.02.028.
- [88] X. Song, S. Xie, K. Lu, and C. Wang, "Mesenchymal stem cells alleviate experimental asthma by inducing polarization of alveolar macrophages," (in eng), *Inflammation*, vol. 38, no. 2, pp. 485-92, Apr 2015, doi: 10.1007/s10753-014-9954-6.
- [89] H. F. Ou-Yang, Y. Huang, X. B. Hu, and C. G. Wu, "Suppression of allergic airway inflammation in a mouse model of asthma by exogenous mesenchymal stem cells," (in eng), *Exp Biol Med (Maywood)*, vol. 236, no. 12, pp. 1461-7, Dec 2011, doi: 10.1258/ebm.2011.011221.

- [90] C. Orabona *et al.*, "CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86," (in eng), *Nat Immunol*, vol. 5, no. 11, pp. 1134-42, Nov 2004, doi: 10.1038/ni1124.
- [91] H. T. Tan *et al.*, "Tight junction, mucin, and inflammasome-related molecules are differentially expressed in eosinophilic, mixed, and neutrophilic experimental asthma in mice," (in eng), *Allergy*, Sep 2018, doi: 10.1111/all.13619.
- [92] C. A. Akdis, "Does the epithelial barrier hypothesis explain the increase in allergy, autoimmunity and other chronic conditions?," (in eng), *Nat Rev Immunol*, Apr 2021, doi: 10.1038/s41577-021-00538-7.
- [93] M. B. Soyka *et al.*, "Defective epithelial barrier in chronic rhinosinusitis: the regulation of tight junctions by IFN- γ and IL-4," (in eng), *J Allergy Clin Immunol*, vol. 130, no. 5, pp. 1087-1096.e10, Nov 2012, doi: 10.1016/j.jaci.2012.05.052.
- [94] T. Thum, J. Bauersachs, P. A. Poole-Wilson, H. D. Volk, and S. D. Anker, "The dying stem cell hypothesis: immune modulation as a novel mechanism for progenitor cell therapy in cardiac muscle," (in eng), *J Am Coll Cardiol*, vol. 46, no. 10, pp. 1799-802, Nov 2005, doi: 10.1016/j.jacc.2005.07.053.
- [95] M. B. Preda *et al.*, "Short lifespan of syngeneic transplanted MSC is a consequence of in vivo apoptosis and immune cell recruitment in mice," (in eng), *Cell Death Dis*, vol. 12, no. 6, p. 566, Jun 2021, doi: 10.1038/s41419-021-03839-w.
- [96] F. Saldanha-Araujo, E. Melgaço Garcez, A. E. Silva-Carvalho, and J. L. Carvalho, "Mesenchymal Stem Cells: A New Piece in the Puzzle of COVID-19 Treatment," (in eng), *Front Immunol*, vol. 11, p. 1563, 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.01563.
- [97] A. Golchin, E. Seyedjafari, and A. Ardeshirylajimi, "Mesenchymal Stem Cell Therapy for COVID-19: Present or Future," (in eng), *Stem Cell Rev Rep*, vol. 16, no. 3, pp. 427-433, 06 2020, doi: 10.1007/s12015-020-09973-w.
- [98] A. R. R. Weiss and M. H. Dahlke, "Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs," (in eng), *Front Immunol*, vol. 10, p. 1191, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.01191.
- [99] E. Ferrini *et al.*, "Persistency of Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Lungs," (in eng), *Front Cell Dev Biol*, vol. 9, p. 709225, 2021, doi: 10.3389/fcell.2021.709225.
- [100] Y. Feng *et al.*, "Safety and feasibility of umbilical cord mesenchymal stem cells in patients with COVID-19 pneumonia: A pilot study," (in eng), *Cell Prolif*, vol. 53, no. 12, p. e12947, Dec 2020, doi: 10.1111/cpr.12947.

- [101] M. Tynecka *et al.*, "The short-term and long-term effects of intranasal mesenchymal stem cell administration to noninflamed mice lung," (in eng), *Front Immunol*, vol. 13, p. 967487, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.967487.
- [102] S. G. Royce, S. Rele, B. R. S. Broughton, K. Kelly, and C. S. Samuel, "Intranasal administration of mesenchymoangioblast-derived mesenchymal stem cells abrogates airway fibrosis and airway hyperresponsiveness associated with chronic allergic airways disease," (in eng), *FASEB J*, vol. 31, no. 9, pp. 4168-4178, 09 2017, doi: 10.1096/fj.201700178R.
- [103] K. A. Cho, J. K. Lee, Y. H. Kim, M. Park, S. Y. Woo, and K. H. Ryu, "Mesenchymal stem cells ameliorate B-cell-mediated immune responses and increase IL-10-expressing regulatory B cells in an EB13-dependent manner," (in eng), *Cell Mol Immunol*, Jan 2017, doi: 10.1038/cmi.2016.59.
- [104] S. Hagner *et al.*, "T cell requirement and phenotype stability of house dust mite-induced neutrophil airway inflammation in mice," (in eng), *Allergy*, Jun 2020, doi: 10.1111/all.14424.
- [105] J. R. Johnson *et al.*, "Continuous exposure to house dust mite elicits chronic airway inflammation and structural remodeling," (in eng), *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 169, no. 3, pp. 378-85, Feb 01 2004, doi: 10.1164/rccm.200308-1094OC.
- [106] E. C. Cates *et al.*, "Intranasal exposure of mice to house dust mite elicits allergic airway inflammation via a GM-CSF-mediated mechanism," (in eng), *J Immunol*, vol. 173, no. 10, pp. 6384-92, Nov 15 2004, doi: 10.4049/jimmunol.173.10.6384.
- [107] U. Fujii *et al.*, "Effect of a retinoid X receptor partial agonist on airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma," (in eng), *Respir Res*, vol. 18, no. 1, p. 23, 01 23 2017, doi: 10.1186/s12931-017-0507-z.
- [108] S. Provoost, T. Maes, G. F. Joos, and K. G. Tournoy, "Monocyte-derived dendritic cell recruitment and allergic T(H)2 responses after exposure to diesel particles are CCR2 dependent," (in eng), *J Allergy Clin Immunol*, vol. 129, no. 2, pp. 483-91, Feb 2012, doi: 10.1016/j.jaci.2011.07.051.
- [109] A. G. Besnard, D. Togbe, N. Guillou, F. Erard, V. Quesniaux, and B. Ryffel, "IL-33-activated dendritic cells are critical for allergic airway inflammation," (in eng), *Eur J Immunol*, vol. 41, no. 6, pp. 1675-86, Jun 2011, doi: 10.1002/eji.201041033.
- [110] B. Bosnjak *et al.*, "Intranasal challenge with increasing ovalbumin doses differently affects airway hyperresponsiveness and inflammatory cell accumulation in mouse

- model of asthma," (in eng), *Inflamm Res*, vol. 58, no. 11, pp. 773-81, Nov 2009, doi: 10.1007/s00011-009-0046-2.
- [111] M. M. Gueders *et al.*, "Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production," (in eng), *Inflamm Res*, vol. 58, no. 12, pp. 845-54, Dec 2009, doi: 10.1007/s00011-009-0054-2.
- [112] K. Kitamura *et al.*, "Critical role of the Fc receptor gamma-chain on APCs in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness and inflammation," (in eng), *J Immunol*, vol. 178, no. 1, pp. 480-8, Jan 01 2007, doi: 10.4049/jimmunol.178.1.480.
- [113] N. Mizutani, T. Nabe, and S. Yoshino, "Complement C3a regulates late asthmatic response and airway hyperresponsiveness in mice," (in eng), *J Immunol*, vol. 183, no. 6, pp. 4039-46, Sep 15 2009, doi: 10.4049/jimmunol.0901468.
- [114] N. W. Bartlett *et al.*, "Mouse models of rhinovirus-induced disease and exacerbation of allergic airway inflammation," (in eng), *Nat Med*, vol. 14, no. 2, pp. 199-204, Feb 2008, doi: 10.1038/nm1713.
- [115] S. Ferretti, O. Bonneau, G. R. Dubois, C. E. Jones, and A. Trifilieff, "IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger," (in eng), *J Immunol*, vol. 170, no. 4, pp. 2106-12, Feb 15 2003, doi: 10.4049/jimmunol.170.4.2106.
- [116] T. S. Lim, J. K. Goh, A. Mortellaro, C. T. Lim, G. J. Hämmerling, and P. Ricciardi-Castagnoli, "CD80 and CD86 differentially regulate mechanical interactions of T-cells with antigen-presenting dendritic cells and B-cells," (in eng), *PLoS One*, vol. 7, no. 9, p. e45185, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0045185.
- [117] S. P. Bak, M. S. Barnkob, A. Bai, E. M. Higham, K. D. Wittrup, and J. Chen, "Differential requirement for CD70 and CD80/CD86 in dendritic cell-mediated activation of tumor-tolerized CD8 T cells," (in eng), *J Immunol*, vol. 189, no. 4, pp. 1708-16, Aug 15 2012, doi: 10.4049/jimmunol.1201271.

XIII) ZGODY KOMISJI ETYCZNYCH NA PRZEPROWADZENIE DOŚWIADCZEŃ

UCHWAŁA NR 35/2019

z dnia 26.04.2019 r.

Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Olsztynie

§ 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1 / art. 48 ust. 1 pkt. 2¹ ustawy z dnia 15 stycznia 2015r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą” po rozpatrzeniu wniosku pt.: **„Zastosowanie ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych (hADMSCs) w kontrolowaniu alergicznego zapalenia płuc indukowanego ekstraktem roztocza kurzu domowego (HDM)”** z dnia 11.04.2019 r., złożonego przez **Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Centrum Medycyny Doświadczalnej (0099)**, adres Marii Skłodowskiej - Curie 24 A 15-276 Białystok, zaplanowanego przez **Andrzej Eljaszewicz**², przy udziale³ (nie dotyczy) Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ⁴

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku **31/2019**.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § , Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: **Badania w celu opracowania i produkcji produktów leczniczych, środków spożywczych, pasz lub innych substancji lub produktów, lub badań ich jakości, skuteczności lub bezpieczeństwa stosowania (F)**.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: **umiarkowana**.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków: **54 szt., mysz domowa (*Mus musculus*) szczep wsobny C57CL/6cmdb; samice wiek 6-8 tygodni**.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: **Małgorzata Mackiewicz, Katarzyna Podłaszczyk, Agnieszka Popielska, Aneta Czeladko, Anna Maraszkiwicz, Julia Szewczyk, Elżbieta Emilia Łapińska, Ewelina Białous, Jeneralczuk Justyna, Ptaszyńska Iwona, Andrzej Eljaszewicz, Kamil Grubczak, Marlena Tynecka**.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie⁵ **od 01.06.2019 do 30.05.2020**.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku⁶: **nie dotyczy**
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w: **nie dotyczy**
8. Użyte do procedur zwierzęta dzięki zostaną odłowione przez , w sposób: **nie dotyczy**
9. Doświadczenie **nie zostanie** poddane ocenie retrospektywnej.

§ 3

¹ Niewłaściwy zapis usunąć

² imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia

³ Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

⁴ Niewłaściwy zapis usunąć

⁵ Nie dłużej niż 5 lat

⁶ Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik

Uzasadnienie: Po dokonaniu oceny wniosku zgodnie z art. 47 ust. 1 i 2 ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266) Lokalna Komisja Etyczna w Olsztynie stwierdza, że projekt nie budzi zastrzeżeń pod względem celowości jego wykonania, liczby użytych zwierząt oraz zasadności i klasyfikacji procedur objętych wnioskiem i wyraża zgodę na przeprowadzenie doświadczenia. Osobą odpowiedzialną za przeprowadzenie badań zgodnie z procedurami opisanymi we wniosku jest **Andrzej Eljaszewicz**.

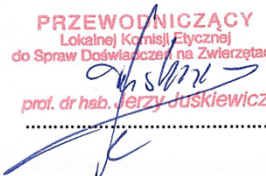
§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

UNIwersytet WARMIŃSKO-MAZURSKI
w Olsztynie
LOKALNA KOMISJA ETYCZNA
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach
10-718 Olsztyn, ul. Oczapowskiego 13/4

Podpis przewodniczącego komisji

PRZEWODNICZĄCY
Lokalnej Komisji Etycznej
do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach

prof. dr hab. Jerzy Juszkiewicz

Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – t.j.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

- 1) Użytkownik,
- 2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
- 3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje: Osoba planująca doświadczenie; Zespół ds. dobrostanu.

**KOMISJA BIOETYCZNA
PRZY UNIWERSYTECIE MEDYCZNYM W BIAŁYMSTOKU**

ul. Jana Kilińskiego 1
15-089 Białystok
tel. 85 748 54 07, fax 85 748 55 08
komisjabioetyczna@umb.edu.pl

Białystok, 25.02.2021 r.

Uchwała nr: APK.002.114.2021

Na podstawie art. 29 ust. 2 i 14 ustawy dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentystry (t.j. Dz. U z 2020, poz. 514 ze zm.), Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku, po zapoznaniu się z projektem badania zgodnie z zasadami GCP/ Guidelines for Good Clinical Practice /- **w y r a ż a z g o d ę** na prowadzenie tematu badawczego: „Wykorzystanie mezenchymalnych komórek macierzystych, fibroblastów oraz acelularnych rusztowań na bazie ludzkiej skóry pochodzących z fałdów skórno-tłuszczowych w modelach eksperymentalnych” przez dr hab. Andrzeja Eljaszewicza wraz z zespołem badawczym z UMB.

Planowany okres realizacji od 25.02.2021 r. do 10.03.2026 r.

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej przy UMB

prof. dr hab. Otylia Kowal-Bielecka

Pouczenie:

1. Odwołanie od uchwały komisji bioetycznej wyrażającej opinię może wnieść:

1) wnioskodawca;

2) kierownik podmiotu, w którym eksperyment medyczny ma być przeprowadzony;

3) komisja bioetyczna właściwa dla ośrodka, który ma uczestniczyć w wieloośrodkowym eksperymencie medycznym.

2. Odwołanie, o którym mowa w ust. 1, wnosi się za pośrednictwem komisji bioetycznej, która podjęła uchwałę, do Odwoławczej Komisji Bioetycznej w terminie 14 dni od dnia doręczenia uchwały wyrażającej opinię.

**XIV) INFORMACJA O CHARAKTERZE UDZIAŁU WSPÓŁAUTORÓW
W PUBLIKACJACH WRAZ Z SZACUNKOWYM OKREŚLENIEM
PROCENTOWEGO WKŁADU**

Tytuł oryginału: Old friends with unexploited perspectives: current advances in mesenchymal stem cell-based therapies in asthma; Stem Cell Reviews and Reports, 2021 : 17, s. 1323-1342; DOI: 10.1007/s12015-021-10137-7.

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału	Procentowy wkład
doktorant– mgr Marlena Tynecka	Przegląd literatury, przygotowanie projektu manuskryptu, przygotowanie i opracowanie rycin oraz tabel	70%
Prof. dr hab. Marcin Moniuszko	Sugestie oraz wprowadzenie poprawek do manuskryptu	10%
Dr hab. Andrzej Eljaszewicz	Pomoc w przygotowanie manuskryptu.	20%

Tytuł oryginału: The short-term and long-term effects of intranasal mesenchymal stem cell

administration to noninflamed mice lung; *Frontiers In Immunology*, 2022; DOI:

10.3389/fimmu.2022.967487

Imię i nazwisko współautora	Charakter udziału	Procentowy wkład
Doktorant- mgr Marlena Tynecka	Wiodąca rola w prowadzeniu badań, analiza i interpretacja danych, przygotowanie projektu manuskryptu	55%
Lic. Adrian Janucik	Analiza i interpretacja danych, pomoc w przygotowaniu rycin, przygotowanie projektu manuskryptu	15%
Dr n. med. Magdalena Niemira	Pomoc w przeprowadzeniu badań, analiza i interpretacja danych	3%
Mgr Arkadiusz Żbikowski	Pomoc w przeprowadzeniu badań	2%
Mgr Nino Stocker	Pomoc w przeprowadzeniu badań	1%
Mgr Agnieszka Tarasik	Pomoc w przeprowadzeniu badań	1%
Mgr Aleksandra Starosz	Pomoc w przeprowadzeniu badań	1%
Dr Kamil Grubczak	Pomoc w przeprowadzeniu badań	1%
Mgr Anna Szałkowska	Pomoc w przeprowadzeniu badań	1%
Mgr Urszula Korotko	Pomoc w przeprowadzeniu badań	1%
Dr hab. Joanna Reszeć	Pomoc w przeprowadzeniu badań	1%
Dr hab. Mirosław Kwaśniewski	Pomoc w analizie danych i interpretacji	1%
Prof. dr hab. Adam Krętowski	Pomoc w analizie danych i interpretacji	1%
Prof. dr hab. Cezmi Akdis	Walidacja danych, rewizja manuskryptu	1%
Dr hab. Milena Sokołowska	Walidacja danych, rewizja manuskryptu	1%
Prof. dr hab. Marcin Moniuszko	Stworzenie koncepcji badań, pomoc w przeprowadzeniu badań, walidacja danych, rewizja manuskryptu, nadzorowanie pracy	4%
Dr hab. Andrzej Eljaszewicz	Stworzenie koncepcji badań, pomoc w przeprowadzeniu badań, analiza i interpretacja danych, walidacja danych, przygotowanie projektu manuskryptu, rewizja manuskryptu, nadzorowanie pracy	10%

Oświadczam, że wszyscy współautorzy wyrazili zgodę na wykorzystanie powyższych publikacji w pracy doktorskiej.

Podpis

XV) OŚWIADCZENIE O WDROŻENIOWOŚCI PROWADZONYCH BADAŃ

Białystok, dnia 25 stycznia 2022

Dział Projektów Pomocowych
Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Oświadczenie

Oświadczam, iż badania realizowane w ramach projektu Krajowych Międzysektorowych Studiów Doktoranckich mają charakter aplikacyjny. Prowadzone przeze mnie badania skupiają się na poznaniu mechanizmów działania mezenchymalnych komórek macierzystych i/ lub ich produktów wydzielniczych w zapaleniu dolnych dróg oddechowych w przebiegu astmy. Udowodniłam iż, izolowane przeze mnie mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs) pochodzące z tkanki tłuszczowej ograniczają zapalenie dolnych dróg oddechowych. Ponadto, w niniejszych badaniach wskazałam również dotychczas nie opisywane w literaturze mechanizmy immunosupresyjnego działania MSCs. Wyniki tych badań mogą zatem z jednej strony przybliżyć nas do opracowania terapii komórkowych, ale też posłużyć jako strategia w poszukiwaniu nowych punktów uchwytu terapeutycznego w astmie. Dodatkowym, interesującym aspektem aplikacyjnym prowadzonych przeze mnie badań może być zastosowanie produktów wydzielniczych MSCs (mikropęcherzyków). Wykorzystanie mikropęcherzyków pozwala pominąć i zminimalizować problemy związane z terapią opartą o komórki. Potencjał wdrożeniowy projektu „*Makropotencjał mikropęcherzyków - optymalizacja pozyskiwania preparatu pochodzącego z mezenchymalnych komórek macierzystych jako potencjalnej strategii terapeutycznej w leczeniu przewlekłych chorób dróg oddechowych*” został doceniony przez kapitułę finałową składającą się ze specjalistów aplikacyjnych w konkursie RundaT organizowanym przez Fundację Technotalenty, gdzie zwyciężył w kategorii Science.

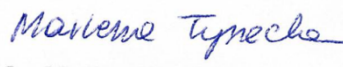
Z poważaniem,


Dr hab. Andrzej Eljaszewicz

Promotor/ opiekun naukowy
projektu


Dr Monika Kolanowska

Mentor
Warsaw Genomics


Mgr Marlena Tynecka

Doktorant