

وضع طريقة لعزل الخلايا الجذعية مخبرياً وانتقاء الطريقة الأكثر دقة وإمكانية استخدام هذه الخلايا في العلاجات الورمية

ريم زكريا سلطون*، تمارى سليمان علي**، د.هيثم يازجي***

(*طلاب كلية الصيدلة، جامعة المنارة)

(***عضو هيئة تدريسية، كلية الصيدلة، جامعة المنارة، البريد الإلكتروني: haissam.yazaji@manara.edu.sy)

الملخص

تؤدي الخلايا الجذعية إلى تمايز الخلايا وبناء بنى الأنسجة في الجسم، حيث تتسم هذه الخلايا بالمرونة، تحدد التعديلات المرتبطة بالإشارات المتخصصة، تمايز الخلايا الجذعية وإعادة البرمجة الخلوية. تلعب الخلايا الجذعية دوراً مهماً في تطور الأورام، وهي قادرة على توليد المتعضيات ثلاثية الأبعاد. سيؤدي فهم خصائص الخلايا الجذعية إلى تحسين القدرة على الحفاظ على توازن الأنسجة. تفتح العضيات المشتقة من الخلايا الجذعية طرقاً جديدة لنمذجة الأمراض البشرية والطب التجديدي. ومع ذلك، بالإضافة إلى الإنجازات في أبحاث الخلايا الجذعية، لا يزال يتعين التغلب على العديد من التحديات حتى يكون للخلايا الجذعية تطبيقات متعددة الاستخدامات.

غالباً ما يؤدي الهدف غير الكافي وغير المحدد للنهج العلاجية التقليدية في علاج السرطان إلى مقاومة العلاج وتكرارية الإصابة به. على مدى العقود الماضية، قدمت الاكتشافات المتراكمة حول بيولوجيا الخلايا الجذعية مناهج محتملة جديدة لعلاج مرضى السرطان. تمتلك الخلايا الجذعية إجراءات بيولوجية فريدة، بما في ذلك التجديد الذاتي، والهجرة، والتمايز، والتأثيرات المعدلة على الخلايا الأخرى، والتي يمكن استخدامها في الطب التجديدي، والحاملات علاجية، واستهداف الأدوية، وتوليد الخلايا المناعية.

كلمات مفتاحية: الخلايا الجذعية، عزل الخلايا، تحضير الخلايا، تطبيقات علاجية جديدة، علاج الأورام.

1. مقدمة

ظهر مصطلح الخلايا الجذعية (SC) في الأدبيات العلمية منذ عام 1868 في منشور كتبه إرنست هيجل. ومع ذلك، لم يتم تقديم دليل قاطع على وجود SCs في نظام مكونات الدم إلا في الستينيات، حيث وصف تيل وماكولوتش وجود سلائف مولدات نقي العظم (BM) التي تنشئ مستعمرات طحال عيانية بعد أن تم حقنها في الفئران المضيفة المعرضة للإشعاع. بناءً على هذا العمل البارز، تم اقتراح السمتين المعياريتين الذهبيتين للخلايا الجذعية: الخلايا الجذعية القادرة على التجديد الذاتي على المدى الطويل والتمايز متعدد السلالات.

الخلايا الجذعية الموجودة في أجسامنا هي المسؤولة عن الحفاظ على توازن الأنسجة؛ ومع ذلك، فإن تحديد علامات محددة لـ SCs

في الجسم الحي يظل التحدي الأكبر في مجال أبحاث الخلايا الجذعية. مكّنت التطورات الحديثة في تتبع النسب من التوسيم الجيني لخلية واحدة أو مجموعة من الخلايا في سياق فيزيولوجي طبيعي وهي طريقة فعالة لمعايرة مساهمة الخلايا الجذعية في الأنسجة في الاستتباب أو المرض. علاوة على ذلك، فإن إنشاء الخلايا الجذعية الجنينية والخلايا الجذعية المحفزة متعددة القدرات تسلط الضوء على إمكانات تطبيق الخلايا الجذعية في الطب التجديدي.

2. تصنيف الخلايا الجذعية

الخلايا الجذعية هي خلايا غير متخصصة في جسم الإنسان. وتملك القدرة على التمايز إلى أي خلية من العضيات، بالإضافة لقدرتها على التجدد الذاتي. توجد الخلايا الجذعية في كل من

القدرات. ثم تقتصر قدرات التباين على خلايا سلالتها. ومع ذلك، فإن بعض الخلايا متعددة القدرات قادرة على التحول إلى أنواع خلايا غير ذات صلة، مما يشير إلى تسميتها بخلايا متعددة القدرات.

يمكن أن تتمايز الخلايا الجذعية القليلة القدرة إلى عدة أنواع من الخلايا. الخلية الجذعية النقية هي مثال يمكن أن ينقسم إلى خلايا دم بيضاء ولكن ليس خلايا دم حمراء.

تتميز الخلايا الجذعية أحادية القدرة بقدرات التمايز الضيقة وخاصة خاصة للإنقسام بشكل متكرر. تجعلهم ميزتهم الأخيرة مرشحاً واعداً للإستخدام العلاجي في الطب التجديدي. هذه الخلايا قادرة على تكوين نوع خلية واحد فقط، على سبيل المثال الخلايا الجذعية.

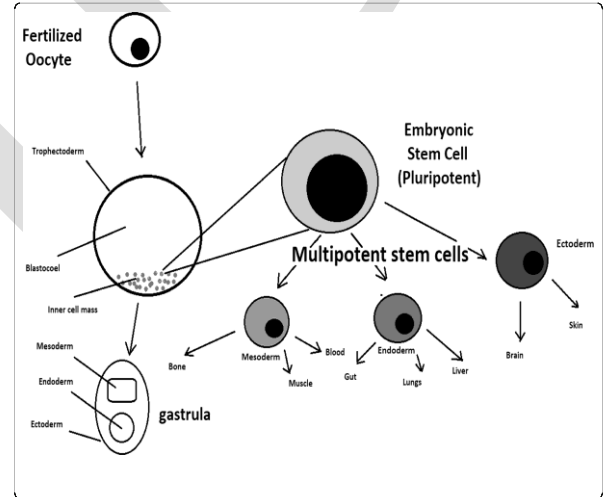
III. الخلايا الجذعية في الأورام

وُلد مفهوم الخلايا الجذعية السرطانية (CSC) من ملاحظة التغيرات النسيجية الواضح في الأورام والملاحظة التي تشير إلى أن ورماً جدياً يمكن أن يبدأ من خلية سرطانية واحدة في فأر. في أوائل التسعينيات، لاحظ ديك وزملاؤه أن معظم الأنواع الفرعية من ابيضاض الدم النقوي الحاد (AML) يمكن تطعيمها بشكل موثوق به في الفئران ذات الكفاءة المناعية وأن تطعيم اللوكيميا لا يمكن أن يبدأ إلا من قطع CD34 + CD38. وهكذا، تم تحديد الخلايا الجذعية السرطانية في AML.

يمكن العثور على بعض السرطانات البشرية التي لا تلتزم بفرضية الخلايا الجذعية السرطانية. وهكذا، فإن مفهوم CSC يشمل، وإن كان بشكل غير كامل، فكرة أن هذا النوع من الخلايا يحافظ على نمو العديد من السرطانات ويمتلك خصائص الخلايا الجذعية، مثل القدرة على التجديد الذاتي وإحداث ذرية "متمايزة". لقد ثبت أن الأورام الصلبة، مثل سرطان الثدي، وسرطان الدماغ، وسرطان البروستات، وسرطان البنكرياس، وسرطان القولون، وسرطان الرئة، وسرطان المبيض، تحتوي على مجموعات فرعية من الخلايا السرطانية ذات قدرة كبيرة على انتشار الأورام في فحوصات نقل الزرع. بالإضافة إلى ذلك، أثبتت الدراسات التي أجريت على نماذج الفئران المميزة للأورام أن الأورام تحتوي على خلايا تعمل بمثابة

الأجنة والخلايا البالغة. ويوجد هناك عدة خطوات للتخصص. تتخفف القدرة على التمايز مع كل مرحلة، مما يعني أن الخلية الجذعية أحادية القدرة غير قادرة على التمايز إلى العديد من أنواع الخلايا مثل الخلايا متعددة القدرات.

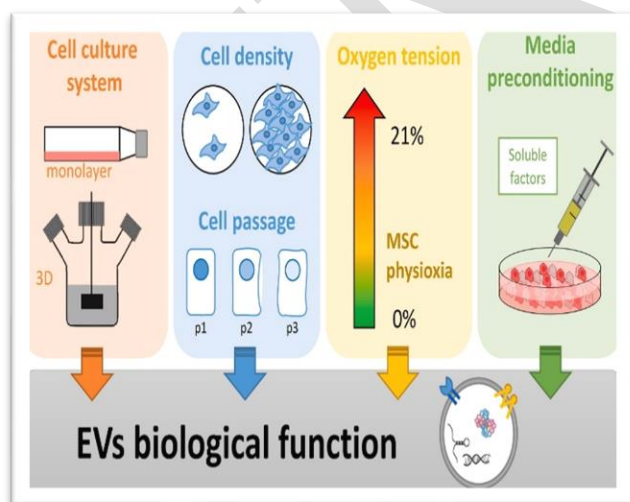
تملك الخلايا الجذعية متعددة القدرات القدرة على الانقسام والتمايز إلى خلايا الكائن الحي بأكمله. تتمتع خاصية تعدد القدرات بأعلى إمكانية تمايز وتسمح للخلايا بتشكيل هياكل جنينية وخارجية. مثال على الخلايا متعددة القدرات هو الزيجوت Zygote، الذي يتشكل بعد أن تقوم الحيوانات المنوية بتخصيب البويضة. يمكن لهذه الخلايا التطور لاحقاً إما في أي من الطبقات المنتشرة الثلاث أو تكون مشيمة. بعد حوالي 4 أيام، تصبح كتلة الخلايا الداخلية للكيسة الأرومية متعددة القدرات. هذا الهيكل هو مصدر الخلايا متعددة القدرات.



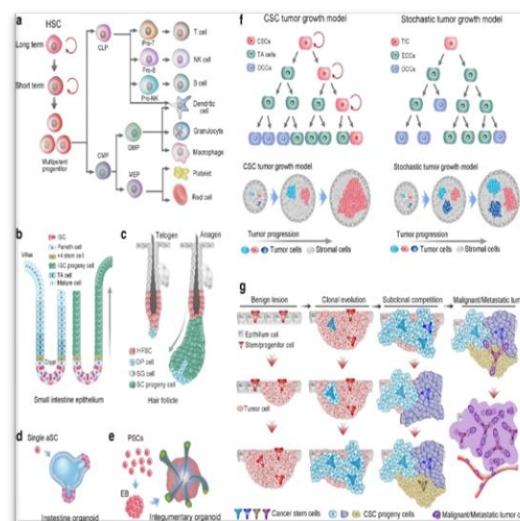
الشكل 1. تطور وتكوين الخلايا الجذعية: تتكون الخلايا الأرومية من خلايا بويضية، وتتكون من خلايا جذعية جنينية تتمايز لاحقاً إلى خلايا الأديم المتوسط أو الأديم الظاهر أو الأديم الداخلي. يتطور Blastocoel إلى المعدة.

تمتلك الخلايا الجذعية متعددة القدرات طيفاً أضيق من التمايز من PSCs، ولكن يمكنها التخصص في خلايا منفصلة من سلالات خلايا محددة. أحد الأمثلة على ذلك هو الخلية الجذعية المكونة للدم، والتي يمكن أن تتطور إلى عدة أنواع من خلايا الدم. بعد التمايز، تصبح الخلية الجذعية المكونة للدم خلية قليلة oligo

إن واحدة من أكبر المعوقات في البحوث المتعلقة بالحوصلات الخارج خلوية هي إنتاج مواد كافية بطريقة متسقة وفعالة باستخدام نماذج الخلايا المختبرية. قد يؤدي التحكم في ظروف نمو الخلايا الجذعية ذات الخصائص الفيزيائية (مثل نظام الزرع وكثافة الخلايا)، وتوتر الأكسجين والتحضير المسبق للأوساط بعوامل قابلة للذوبان، إلى نشاط نظير صماوي داخلي بشكل مباشر عن طريق تعديل شحن الحوصلات وتكوينها الحيوي (الشكل 3).



شكل 3. ظروف زرع الخلايا الجذعية التي تؤثر على الوظيفة البيولوجية للحوصلات الخارج خلوية.



الشكل 2. الخلايا الجذعية في الأنسجة والعضوية

الخلايا الجذعية السرطانية وتغذي نمو الورم بشكل كبير، بصرف النظر عن الجين الورمي المستخدم وأصل الأنسجة لهذه الأورام.[1]

الحويصلة الخارج خلوية (Extracellular vesicle) EV) هو المصطلح العام للجسيمات المتحررة بشكل طبيعي من الخلية والتي يتم تحديدها بواسطة طبقة ليبيدية ثنائية والتي لا يمكنها التكاثر. يتكون غشاء الحويصلة الخارج خلوية من طبقة ليبيدية ثنائية مع بروتينات متكاملة تحمي محتوى الحويصلة من أنزيمات البروتياز والنوكلياز. تحتوي الحويصلات خارج الخلوية على مستقبلات سطحية وغشاء وبروتينات قابلة للذوبان ودهون وأحماض نووية (أنواع مختلفة من الحمض النووي الريبي، ولكن أيضاً الحمض النووي الجيني والحمض النووي للميتوكوندريا). يتم إفراز هذه الحويصلات بواسطة خلايا من جميع الأنسجة والعضيات داخل جسم الإنسان وهي آلية مهمة للاتصال الخلوي للتبادل الأفي لمركباتها النشطة بيولوجياً.

تعتبر الخلايا الجذعية ذات أهمية خاصة لأنها تساهم في إصلاح الأنسجة وتمتلك خصائص مناعية قوية ومضادة للالتهابات. وبشكل أكثر تحديداً، أثبتت الحوصلات خارج الخلوة المشتقة من

أوساط 20 مل من يوم واحد باستخدام مفاعل بيولوجي، يفترض استخدام 53 قارورة T175، أي 800 مل من الأوساط. علاوة على ذلك، فإن الأنظمة ثلاثية الأبعاد قادرة على التقاط الجوانب الفيزيولوجية المفقودة في الأنظمة ثنائية الأبعاد التقليدية، مثل بنية الأنسجة وتكوين المطرق خارج الخلوي وتفاعلات خلية-خلية المتغيرة.

VII. كثافة الخلايا وعبر الخلايا

عادة ما يتم إنتاج الحويصلات الخارج خلوية من مزارع الخلايا الجذعية بنسبة 60-90%. وقد ارتبطت كثافة الزرع المنخفضة بالتكاثر السريع لأن الخلايا الجذعية تعاني من تثبيط التماس بكثافة أعلى، مما يؤدي إلى السكون. علاوة على ذلك، ثبت أن مزارع الخلايا الجذعية المتوافقة تظهر انخفاضاً بمقدار 10 أضعاف في الاستقلاب مقارنة بالخلايا في حالة ما قبل الانتشار. مجتمعة، يمكن أن تؤثر كثافة الخلايا الجذعية على مصير الخلايا الجذعية وتسبب تغيرات جينية، مما قد يؤثر بدوره على إفراز EVs والمحتويات. والواقع أنه ثبت أن الخلايا الجذعية المتوسطة (MSCs) ذات الكثافة العالية (الخلايا 10 000/سم²) أظهرت انخفاضاً بمقدار 100 ضعف في إنتاج EVs مقارنة بالخلايا المصنفة بكثافة منخفضة (الخلايا 100/سم²). وبناء على ذلك، أشير إلى أن الاتصال المباشر خلية-خلية المحدود في الوسط الزراعي الأقل انتشاراً قد يتطلب زيادة الاتصالات غير التلامسية، مثل تلك التي تحركها EVs، مما يؤدي إلى زيادة إنتاج وإطلاق المركبات الكهربائية لكل خلية. يرتبط التوسع المخبري طويل الأمد للخلايا الجذعية للحصول على ما يكفي من EVs بالشيخوخة المتكررة. على الرغم من عدم الانقسام، إلا أن هذه الخلايا الجذعية لا تزال نشطة استقلابياً وتؤثر على الخلايا المحيطة. كجزء من النمط الظاهري الإفرازي المرتبط بالشيخوخة، تطلق الخلايا الجذعية الشائخة عوامل قابلة للذوبان، ولكن أيضاً الحويصلات الخارج خلوية كناقلات لإشارات الشيخوخة.

وقد أبلغ مؤخراً عن حدوث تغيرات في تحرر EVs بواسطة الخلايا الجذعية الخالية من الأنسجة: فقد زاد إنتاج EVs في النماذج المحفزة بالعلاج، والمحفزة H₂O₂، والمحفزة بالإشعاع، والمحفزة

قبل كل شيء، يجب اختيار الخلايا الجذعية المنتجة بالنظر إلى الاستخدام المقصود، لأن EVs قد تعكس أنماط التعبير الجيني ووظيفة (وظائف) الخلية المنتجة. يمكن عزل الخلايا الجذعية بنجاح من نقي العظم والدهون والحبال السرية والكبد والجلد ولب الأسنان والأنسجة الأخرى. الأنواع الثلاثة الأولى هي الأكثر دراسة على نطاق واسع. تمارس الخلايا الجذعية لنقي العظام العديد من الوظائف البيولوجية، على الرغم من ضعف قدرتها على التوسع في المختبر مما يعيق إنتاج EVs على نطاق واسع للاستخدام السريري. من السهل الحصول على الخلايا الجذعية المشتقة من الدهون وتوسيعها، لكنها تتطوي على خطر تحريض الورم الذي قد ينعكس في تأثيرات الحويصلات الخارج خلوية. تمتلك الخلايا الجذعية المشتقة من الحبل السري قدرة قوية على التمدد وتأثيرات علاجية جيدة في إصلاح الأنسجة وتجديدها. توفر مزارعها إنتاجاً واسع النطاق للحويصلات الخارج خلوية للتطبيقات السريرية. إن دراسات المقارنة للحويصلات الخارج خلوية المشتقة من الخلايا الجذعية حسب أصل الأنسجة محدودة. علاوة على ذلك، من الصعب مقارنة هذه الدراسات مباشرة لأنها لم تجر بأساليب مماثلة للتمييز والعزل والتوصيف. ومع ذلك، يُقترح أن EVs المستمدة من الخلايا الجذعية قد تظهر خصائص وفعاليات مختلفة اعتماداً على الخلايا الجذعية الناشئة.

VI. النظم الزراعية لإنتاج الحويصلات الخارج خلوية

تشمل أنظمة زرع الخلايا الجذعية الأنظمة ثنائية الأبعاد (D2) وثلاثية الأبعاد (D3). تشمل الأنظمة ثنائية الأبعاد قوارير البوليسترين الشائعة polystyrene flasks، في حين أن الأنظمة ثلاثية الأبعاد تتكون بشكل أساسي من مفاعلات حيوية، مثل المفاعلات الحيوية ذات الغرفتين two-chamber bioreactor أو الألياف المجوفة hollow-fiber bioreactor، حيث يمكن زرع الخلايا الجذعية بكثافة أعلى مما يتيح الإنتاج الصناعي ل EVs. ينتج الوسط الزراعي للمفاعل الحيوي ما يصل إلى 40 ضعفاً من الحويصلات الخارج خلوية لكل مل من الأطباق المتوسطة مقارنة بالأطباق ثنائية الأبعاد الشائعة. والواقع أن التقديرات تشير إلى أنه للحصول على نفس الكمية من EVs في

بالورم، والشيخوخة المتكررة. لذلك، يبدو أن إنتاج EVs يزداد في أنواع الخلايا المتعددة بعد مجموعة متنوعة من العوامل المسببة والمحفزة للشيخوخة.

تعاني الخلايا الجذعية من تغيرات في محتواها من الخلايا البلازمية والنوعية بعد الشيخوخة وهو ما ينعكس بدوره في تكوين EVs المستمدة من هذه الخلايا ومحتوياتها اللمعية . تقصير القسم الطرفي (Telomere) هو أحد الجوانب الرئيسية للشيخوخة المتكررة المصحوبة بالتعبير عن الحمض النووي الريبي المحتوي على القسم الطرفي (TERRA) داخل السيتوبلازم. تم اكتشاف TERRA في الحويصلات الخارج خلوية من الخلايا الشائخة المتكررة، وهذه الحويصلات تحفز التعبير الجيني المضاد للالتهابات في الخلايا المتلقية. وبالمثل، تم تحديد العديد من miRNAs، مثل miR-21-5p و miR-217، لتنظيمها في الخلايا البطانية الأبهريّة البشرية الشائخة (HAECs) وحويصلاتها الخارج خلوية. وبشكل أكثر تحديداً، تمكنت EVs الشائخة من نقل هذه الـ miRNAs إلى الخلايا المتلقية، مما قلل من التعبير عن SIRT1 و DNA ميتيل ترانسفيراز 1 (DNMT1)، مما أدى إلى انخفاض الانتشار وزيادة علامات الشيخوخة. مجتمعة، يبدو أن مزارع الخلايا الجذعية بكثافة منخفضة وكذلك الممرات القصيرة تحافظ على إنتاج وجودة أفضل للحويصلات الخارج خلوية.

VIII. الضغط الجزئي للأوكسجين

في الجسم الحي، يكون ضغط الأوكسجين داخل الأنسجة أقل بكثير من الـ 21% O₂ الموجود في غلافنا الجوي. وينبغي زرع الخلايا الجذعية التي يتم الحصول عليها من الأنسجة البالغة في المختبر بمستويات الأوكسجين التي تعكس الأوعية الدموية للأنسجة التي تأتي منها، والتي تتراوح من 0 إلى 1% في نقي العظام و 12% O₂ في الدم المحيطي. وتماشياً مع ذلك، أفادت عدة دراسات أن MSCs المزروعة تحت ضغط الأوكسجين المنخفض تحتفظ بقدراتها على التكاثر والتمايز وكذلك التعبير عن الجينات متعددة القدرات عند مقارنتها بالمزروعة تحت ضغط الأوكسجين في الغلاف الجوي.

ومن المثير للاهتمام أن الأوكسجين له تأثير أيضاً على الإشارات النظير صماوية للخلايا الجذعية. في الواقع، ذكرت دراسة أن تركيز EVs كان أقل في اليوم الثالث، وأعلى في يوم السابع على الأوساط التي تم الحصول عليها من الخلايا الجذعية المزروعة عند ضغوط عالية للأوكسجين مقارنة بضغوطات الأوكسجين المنخفضة. تشير هذه النتيجة إلى أن زرع الخلايا الجذعية تحت ضغوطات الأوكسجين المختلفة يمكن أن تحدث تغييرات في الـ EVs المتحررة. هذه الزيادة في تركيز EVs، جنباً إلى جنب مع تنظيم miRNAs التي تستهدف مسار إشارات FOXO في ضغط الأوكسجين العالي في اليوم السابع، تدعم الفرضية القائلة بأن الخلايا الجذعية المزروعة تستجيب للإجهاد التأكسدي وتنتشر هذه الاستجابة في شحن EVs miRNA. علاوة على ذلك، وُصف سابقاً الخصائص المفيدة للحويصلات الخارج خلوية المشتقة من MSC غير الشائخة، المزروعة في ضغط الأوكسجين الفيزيولوجي المنخفض (3% O₂) إلى MSC الشائخ قبل الأوان، المزروع في محيط شديد الأكسجة (21% O₂). تضمنت التأثيرات الملحوظة انخفاض نشاط الغالاكتوزيداز galactosidase المرتبط بالشيخوخة - β - ted، والإفراط في التعبير عن العوامل المرتبطة بتعدد القدرات، وتحول الاستقلاب النشط نحو تحلل السكر. وأدت هذه الشحنات من EVs إلى فرط التعبير عن miR-302b و HIF-1α في الخلايا المستهدفة.

وأفادت التقارير بأن الحويصلات الخارج خلوية المتحررة من MSCs المزروعة بأوساط منخفضة الأوكسجين تزيد من تكون الأوعية الدموية عند استخدامها لعلاج احتشاء عضلة القلب الحاد. كذلك، في نموذج الطعم الدهني، أدى العلاج بـ EVs من الخلايا الجذعية المشتقة مسبقاً من الدهون منخفضة الأوكسجين (ADSCs) إلى تحسين الأوعية الدموية ومعدل البقاء على قيد الحياة. أظهر تحليل بروتينومي proteomic analysis مركب لـ EVs المشتقة من MSCs المزروعة في أوساط منخفضة الأوكسجين أن هذه الحويصلات تسببت في تكوين الأوعية الدموية في الخلايا البطانية عن طريق تنشيط مسار NF-κB. يتم إثراء الحويصلات الخارج خلوية منخفضة الأوكسجين المشتقة مسبقاً بـ miR-21، miR-22، miR-199a-3p، miR-210

التنظيمية للقلب (miR-24a-3p, miR-23a-3p, miR-199a-3p/5p)

على العكس من ذلك، حُلَّت العديد من الدراسات تأثير إضافة عوامل نمو محددة لأوساط الزرع بشأن إمكانات EVs. على سبيل المثال، أثبت علاج ADSCs بعامل النمو المشتق من الصفائح الدموية (PDGF) أنه يحفز تحرر EVs، ويغير تكوينها البروتيني ويعزز إمكاناتها الوراثية. بالمقارنة مع EVs التي تم تحريرها في الظروف الأساسية، حملت PDGF-EVs مجموعة c و SCF التي لعبت دوراً في تكوين الأوعية. كما أن المحتوى المعزز للبروتينات المعدنية المصفوفة في مركبات PDGF-EVs يفسر نشاطها المولد للأوعية. يمكن أيضاً للتحضير المسبق للسيتوكين تعديل الإمكانات نظيرة الصماوية للخلايا الجذعية، بما في ذلك الحويصلات الخارج خلوية. حُلَّت دراسة تأثير تحفيز MSCs مع γ -IFN على إمكانات EVs. ووجدوا أن EVs هذه عززت التأثيرات المثبطة للمناعة. وجد بصمة التعبير عن miRNA داخل هذه الحويصلات من خلال المصفوفة الدقيقة وتحليل المعلوماتية الحيوية أن miRNA 62 معبر عنها بشكل مختلف بشكل كبير عند مقارنتها بالحويصلات المشتقة من MSCs غير المحفزة. وبالمثل، أفادت التقارير بأن EVs المستمدة من أوساط زرع MSCs التي عولجت بمزيج من γ -IFN و β -TGF التي حفزت بشكل أكثر كفاءة على تحويل الخلايا النووية الأحادية إلى خلايا تائية تنظيمية. أظهرت دراسة أخرى تستكشف تأثير الشروط المسبقة للأوساط مع α -TNF على ثقافات ADSCs، أن التأثير التحفيزي لهذه EVs المشتقة من أرومات العظام البشرية كان ممكناً من خلال زيادة المحتوى Wnt-3a مجمعة، تؤدي التهيئة المسبقة للخلايا الجذعية ذات العوامل القابلة للذوبان إلى تغيير محتويات EVs، وبالتالي تعديل إمكاناتها العلاجية.

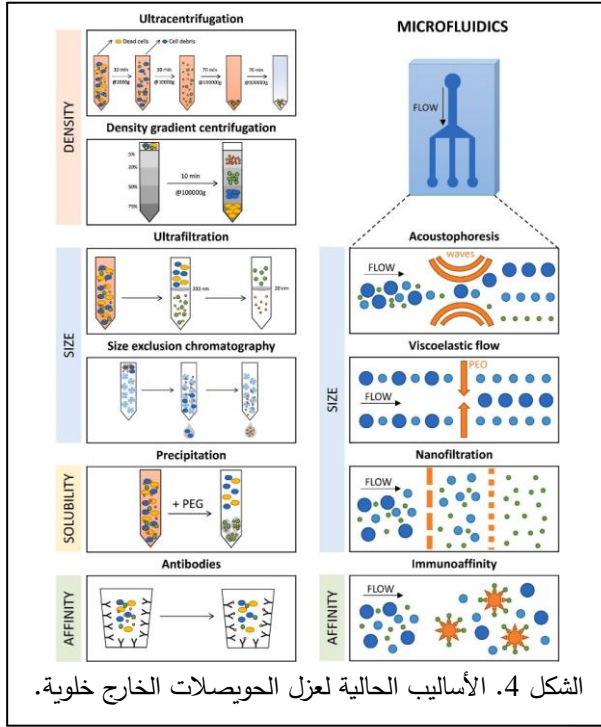
X. طرق عزل وتنقية الحويصلات الخارج خلوية

من المهم أيضاً عزل وتنقية كميات كافية من EVs بطريقة سليمة وقابلة للتكرار. تتضمن العديد من طرق العزل كواشف أو معدات باهظة الثمن غير متوفرة للعديد من المختبرات. تنتج طرق العزل المختلفة مجموعات مختلفة من EVs بدرجة نقاوة مختلفة. قد تؤدي

miR-24 and ، وقد أدى إعطاء هذه الحويصلات إلى تقليل التليف القلبي والموت الخلوي المبرمج مقارنة بـ EVs المتحكم بها. تمارس الحويصلات الخارج خلوية من الخلايا السلفية منخفضة الأكسجين تأثيرات علاجية أفضل في إصابة الأعضاء من خلال شحنات محددة. في الواقع، حُلَّت دراسة ما إذا كانت EVs المشتقة من MSCs منخفضة الأكسجين يمكن أن تمنع عجز الذاكرة في مرض الزهايمر (AD). في هذه الدراسة، وجدوا أن إعطاء EVs من الأوساط المسبقة منخفضة الأكسجين أدى إلى تحسين قدرات التعلم والذاكرة بشكل كبير، وانخفضت مستويات ترسب اللويحات والأميلويد β . لكن لم تتمكن الآلية الأساسية في استعادة الخل المشبكي وتنظيم الاستجابات الالتهابية من خلال تنظيم miR-21 عند الفئران APP/PS1.

IX. طرق التحضير المسبق للأوساط الزرعية

تتوفر الآن في السوق العديد من الأوساط المسماة بـ xeno-free المحددة كيميائياً والمخصصة لدعم نمو الخلايا الجذعية وخصائصها. مصطلح «xeno» يعني غريب؛ وبالتالي فإن xeno-free تعني خالي من المواد الغريبة أي التحرر من المكونات الغريبة أو المكونات من نوع غريب. فيما يتعلق بزرع الخلايا، سيتم اعتبار خطوط الخلايا البشرية المزروعة باستخدام مكونات مشتقة من الإنسان (مثل مصل الإنسان) xeno-free ، نظراً لعدم وجود فرق بين الأنواع. يسمح هذا بالتخلص من مصل الجنين البقري (FBS)، وهو أكثر أنواع المصل استخداماً لزرع خلايا الثدييات. قامت دراسة كاملة جداً بتحليل خصائص EVs المشتقة من MSCs باستزراع أوساط مختلفة. قارنوا خمسة أوساط مختلفة xeno-free ، وهي وسيط قياسي قائم على FBS ووسيط مخفض FBS مكمل بمعامل نمو الأرومات الليفية الأساسية (bFGF). أثبت التحليل الشامل للميزات المورفولوجية والوظيفية والجزئية لـ MSCs وحويصلاتها الخارج خلوية التي تم تحريرها أن الوسط الزراعي الخالي من المواد الغريبة حسن من تحرر EVs بأصغر حجم للنطاق وعززت نشاطها العضلي للقلب. على وجه الخصوص، أُنْزِي الوسط الزراعي ال xeno-free من EVs المشتقة في الجين GATA4، بالإضافة إلى بعض miRNAs



ب. العزل على أساس حجم EVs

هناك العديد من البروتوكولات لعزل EVs وفقاً لحجمها، بما في ذلك الترشيح الفائق واستبعاد الحجم (SEC). يستخدم الترشيح الفائق مرشحات غشائية بأحجام مسام مختلفة تسمح للجسيمات الأصغر بالاختراق والمرور عبر الغشاء بينما يتم الاحتفاظ بجسيمات أكبر. وبالتالي، يتركز جزء EVs ذو حجم محدد. الترشيح الفائق هو بديل زمني وفعال من حيث التكلفة للطرد الفائق ذو المعيار الذهبي. ومع ذلك، يمكن سد مسام الغشاء بسهولة مما يؤدي إلى انخفاض عائد الحويصلات الخارج خلوية. علاوة على ذلك، قد تؤدي القوة المطبقة (الضغط أو الفراغ) لتمرير العينة عبر الغشاء إلى تشوه الحويصلة وتلفها. ويتناسب عدد مراحل الترشيح تناسباً عكسياً مع كمية EVs المعزولة ويتناسب تناسباً طردياً مع نقاء EVs. تتيح الكروماتوغرافيا استبعاد الحجم الفصل القائم على الحجم على عمود واحد، حيث تنبض EVs قبل المكونات الأخرى القابلة للذوبان. يتم تحديد عتبة الحجم من خلال اختيار مصفوفة الاستبعاد، مثل Sepharose 2B بقطر مسام يبلغ 60 نانومتر. تؤثر الأعمدة على نقاء أجزاء EVs: تعزز الزيادة في طول

بعض طرق العزل إلى إجهاد خلوي يؤثر على وظيفة EVs المنتجة. وإجمالاً، فإن هذه المسائل تجعل مقارنة البيانات وتوحيد النتائج أمراً بالغ الصعوبة. وبالتالي، من الضروري وضع طريقة موحدة وقابلة للتكرار ومجدية وفعالة من حيث التكلفة لعزل EVs بشكل سليم عن الوسط الزرعي.

أ. العزل على أساس كثافة EVs

تستخدم الطريقة الكلاسيكية لعزل EVs وفصل الجسيمات وفقاً للكثافة عن طريق الطرد المركزي. في البداية، يتم ترسب الجسيمات عالية الكثافة مثل الخلايا وحطام الخلايا وأجسام الموت الخلوي المبرمج. ثم يتم ترسيب EVs الموجودة في الوسط عن طريق الطرد المركزي الفائق (الشكل 4).

يشجع استخدام نوعين من الدوارات: الدلو المتأرجح ودوار الزاوية الثابتة swinging bucket and fixed angle rotor. لقد ثبت أن نوع الدوار يؤثر على خصائص جزيئات EVs المعزولة، مثل نسبة البروتين إلى الحمض النووي الريبي. ويؤدي عزل EVs بهذه الطريقة إلى مردود ونقاوة متوسطتين لـ EVs. المزايا الرئيسية لهذه التقنية هي مدتها الطويلة والحاجة إلى معدات باهظة الثمن. من ناحية أخرى، تشمل المزايا التلاعب بأحجام كبيرة ونقص الإضافات الكيميائية. نظراً لهذه المزايا وقابليتها للتكرار الجيد، فإن هذه الطريقة هي الأكثر استخداماً لعزل EVs عن زراعة الخلايا والسوائل البيولوجية.

هناك طريقة بديلة هي الطرد المركزي المتدرج للكثافة، والذي يستخدم من أجل زيادة كفاءة فصل الجسيمات إلى كثافتها (الشكل 4). وتتيح هذه الطريقة أيضاً فصل المكونات دون الخلوية مثل الميتوكوندريا والبيروكسيسومات والإندوسومات.

EVs ومكونات أخرى) في حجرة حيث يتم تعريضها للأمواج فوق الصوتية. بشكل عام، يتم استخدام تقنيتين لإنشاء موجات صوتية: الموجة الصوتية الحجمية، والموجة الصوتية السطحية.

ج. العزل بالاعتماد على قابلية ذوبان EVs و/ أو تجمعها:

يمثل الترسيب الناجم عن البوليمر منهجية أخرى شائعة الاستخدام لعزل EV. تتفاعل البوليمرات عالية الحب للماء مع جزيئات الماء المحيطة ب-EVs لتكوين بيئة دقيقة كارهة للماء، مما يؤدي إلى ترسيب EVs. يعد البولي إيثيلين غليكول (PEG) قابل للذوبان في الماء و volume excluding polymer، وهو غير سام وغير مخرب للعينة. يتكون الإجراء من خلط العينة مع محلول البوليمر، وحضانة طوال الليل عند 4 درجات مئوية، وترسيب EVs بواسطة الطرد المركزي منخفض السرعة (1.500 جم). ثم يتم تعليق كرية EV في PBS لمزيد من التحليل. العزل القائم على الترسيب غير مكلف ولا يتطلب معدات خاصة وتسمح باستعادة EVs بنسبة 90٪ ومردود مرتفع. ومع ذلك، تتسبب بوليمرات PEG في ترسيب EVs بالإضافة إلى الجسيمات القابلة للذوبان الأخرى بما في ذلك مجاميع البروتين والأحماض النووية. وبالتالي، فإن العيب الرئيسي في هذه المنهجية هو تلوث العينة. [2]

XI. التطبيقات المحتملة للعلاج بالخلايا الجذعية

في السرطان

تم تطوير استراتيجيات مختلفة لعلاج السرطان باستخدام العلاج بالخلايا الجذعية، بما في ذلك زرع HSC، وضخ MSC لعلاج ما بعد السرطان، والخلايا الجذعية للحاملات العلاجية، وتوليد الخلايا المستجيبة للمناعة، وإنتاج اللقاح (الشكل 5).

أ. زرع HSC

تم استخدام زرع HSC في المقام الأول كإجراء قياسي لعلاج الورم النقوي المتعدد وسرطان الدم والأورام اللمفاوية بعد جولات من العلاج الإشعاعي بجرعات عالية أو العلاج الكيميائي. بالإضافة إلى ذلك، يتم الآن التحقيق في هذا الإجراء على نطاق واسع في

الأعمدة دقة الذروة للجسيمات القريبة في أحجامها، وتسمح الزيادة في قطر الأعمدة بتحليل عينات أكثر تركيزاً بحجم أكبر. بالإضافة إلى ذلك، فإن استخدام المخازن المؤقتة ذات القوة الأيونية العالية يقلل من تلوث مستحضرات EVs. ومن المزايا الكبيرة لطريقة SEC أنها لا تحفز على تجميع EVs وتحافظ على سلامتها ونشاطها المنطقي البيولوجي. هذه التقنية سريعة وقابلة للتكرار، لكنها ذات مردود منخفض وتحتاج إلى مواد ماصة كروماتوغرافية باهظة الثمن.

ت. العزل على أساس الألفة المناعية ل EVs

تتواجد الدهون والبروتينات وعديدات السكاريد على سطح الحويصلات الخارج خلوية. تعتمد التقنيات القائمة على الألفة المناعية على استخدام الجسم المضاد للتفاعل مع الجزيئات على السطح الخارجي ل EVs، مما يسمح بعزل هذه الحويصلات. إن الأجسام المضادة على وجه التحديد مستقبلات الربط مثل tetraspanins (CD9 و CD63 و CD81) وبروتينات الصدمة الحرارية ومستضدات MHC هي الأكثر استخداماً. يمكن ربط هذه الأجسام المضادة بصفائح (مثل ELISA) أو أعمدة الكروماتوغرافيا أو الكريات المغناطيسية أو منصات الموائع الدقيقة. والحد الرئيسي لهذه الطرق هو أن المستضد المستخدم لالتقاط EVs يجب التعبير عنه على السطح، لأن الأجسام المضادة غير قادرة على التقاط مستضد مغلق داخل الحويصلة.

ث. أجهزة الموائع الدقيقة

تقوم أجهزة الموائع الدقيقة بتوجيه تدفق السوائل داخل شبكة من القنوات الصغيرة متناهية الصغر، والتي تتيح فصل العينات وتنقيتها بكفاءة. تلتقط هذه الأجهزة EVs وتفصلها إما بالحجم أو بمبدأ الألفة المناعية.

التقنيات الرئيسية لفصل الموائع الدقيقة القائمة على الحجم الموصوفة حتى الآن هي الرحلان الصوتي، والتدفق اللزج المرن، والترشيح النانوي. تقنية الرحلان الصوتي acoustophoresis هي تقنية عزل الموائع الدقيقة حيث يتم فصل EVs عن المطرق بناءً على حجمها وكثافتها. يتم حقن المطرق (الذي يحتوي على

ب. زرع MSC بعد علاج السرطان

الأسس المنطقية لاستخدام حاملات الخلايا الجذعية في علاج السرطان هي: '1' حماية العوامل العلاجية من التحلل البيولوجي السريع، '2' تقليل الآثار الجانبية الجهازية و '3' زيادة المستويات المحلية للعلاجات بسبب التأثير الجوهري لاستهداف الورم للخلايا الجذعية. تعتمد الفعالية المضادة للورم لهذا النظام على عدد الخلايا الجذعية الموضعية في البيئة الدقيقة للورم.[3,4]

XII. الاستنتاج

تم استخدام أنواع مختلفة من الخلايا الجذعية في العلاج المضاد للسرطانات، اعتماداً على قدراتها الجوهرية. قدمت زراعة HSC إجراءً فعالاً لعلاج السرطانات مثل أورام الدم والورم النقوي المتعدد والأورام اللمفاوية. حيث تستخدم الخلايا الجذعية في علاج الأورام بشكل واسع في الأبحاث العلمية حالياً ويتم دراسة استخدامها في أنواع مختلفة من الأورام. يعد استخدام الخلايا الجذعية في علاج الأورام مجالاً واعداً ومثيراً للاهتمام في الأبحاث العلمية في الوقت الحالي، ومن المتوقع أن يتم العثور على المزيد من التطبيقات لهذه الخلايا في المستقبل.

المراجع

- [1]. Stem cells in tissues, organoids, and cancers, Xusheng Wang; Becker AJ, Mc CE, Till JE (1963) Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197:452–454
- [2]. Kretzschmar K, Watt FM (2012) Lineage tracing. *Cell* 148(1–2):33–45
- [3]. Adams GB, Scadden DT (2006) The hematopoietic stem cell in its place. *Nat Immunol* 7(4):333–337
- [4]. de Rooij DG (2001) Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 121(3):347–354

- the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* 469(7330):415
- [20].Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E (2004) Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* 118(5):635–648
- [21].Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM (1990) Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis. *Cell* 61(7):1329–1337
- [22].Greco V, Chen T, Rendl M, Schober M, Pasolli HA, Stokes N, Dela Cruz-Racelis J, Fuchs E (2009) A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration. *Cell Stem Cell* 4(2):155–169
- [23].Zhang YV, Cheong J, Ciapurin N, McDermitt DJ, Tumber T (2009) Distinct self-renewal and differentiation phases in the niche of infrequently dividing hair follicle stem cells. *Cell Stem Cell* 5(3):267–278
- [24].Jaks V, Barker N, Kasper M, Van Es JH, Snippert HJ, Clevers H, Toftgard R (2008) Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nat Genet* 40(11):1291–1299
- [25].Clevers H (2016) Modeling development and disease with organoids. *Cell* 165(7):1586–1597
- [26].Jain R, Barkauskas CE, Takeda N, Bowie EJ, Aghajanian H, Wang QH, Padmanabhan A, Manderfield LJ, Gupta M, Li DQ, Li L, Trivedi CM, Hogan BLM, Epstein JA (2015) Plasticity of Hopx(+) type I alveolar cells to regenerate type II cells in the lung. *Nat Commun* 6:6727
- [27].Karthaus WR, Iaquinia PJ, Drost J, Gracanin A, Van Boxtel R, Wongvipat J, Dowling CM, Gao D, Begthel H, Sachs N, Vries RGJ, Cuppen E, Chen Y, Sawyers CL, Clevers HC (2014) Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures. *Cell* 159(1):163–175
- [28].Kessler M, Hoffmann K, Brinkmann V, Thieck O, Jackisch S, Toelle B, Berger H, Mollenkopf HJ, Mangler M, Sehoul J, Fotopoulou C, Meyer TF (2015) The Notch and Wnt pathways regulate stemness and differentiation in human fallopian tube organoids. *Nat Commun* 6:8989
- [29].Maimets M, Rocchi C, Bron R, Pringle S, Kuipers J, Giepmans BNG, Vries RGJ, Clevers H, de Haan G, van Os R, Coppes RP (2016) Long-term in vitro expansion of salivary gland stem cells driven by Wnt signals. *Stem Cell Rep* 6(1):150–162
- [30].Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurler ME, Homfray T, Penninger JM, Jackson AP, Knoblich JA (2013) Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 501(7467):373–379
- [31].Pasca SP (2018) The rise of three-dimensional human brain cultures. *Nature* 553(7689):437–445
- [32].Lee J, Boscke R, Tang PC, Hartman BH, Heller S, Koehler KR (2018) Hair follicle development in
- [5].Tumber T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M, Fuchs E (2004) Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* 303(5656):359–363
- [6].Doetsch F (2003) A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 13(5):543–550
- [7].Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, Morgan JE (2005) Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell* 122(2):289–301
- [8].Hirsch E, Iglesias A, Potocnik AJ, Hartmann U, Fassler R (1996) Impaired migration but not differentiation of haematopoietic stem cells in the absence of beta1 integrins. *Nature* 380(6570):171–175
- [9].Wang LD, Wagers AJ (2011) Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(10):643–655
- [10].Weissman IL (2000) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100(1):157–168
- [11].Civin CI, Gore SD (1993) Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. *J Hematother* 2(2):137–144
- [12].Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE (2003) Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res* 34(6):461–475
- [13].Andrews RG, Bryant EM, Bartelmez SH, Muirhead DY, Knitter GH, Bensinger W, Strong DM, Bernstein ID (1992) CD34+ marrow cells, devoid of T and B lymphocytes, reconstitute stable lymphopoiesis and myelopoiesis in lethally irradiated allogeneic baboons. *Blood* 80(7):1693–1701
- [14].Mayani H, Alvarado-Moreno JA, Flores-Guzman P (2003) Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation. *Arch Med Res* 34(6):476–488
- [15].Vermeulen L, Snippert HJ (2014) Stem cell dynamics in homeostasis and cancer of the intestine. *Nat Rev Cancer* 14(7):468–480
- [16].Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H (2007) Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* 449(7165):1003–1007
- [17].Tian H, Biehs B, Warming S, Leong KG, Rangell L, Klein OD, de Sauvage FJ (2011) A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable. *Nature* 478(7368):255–259
- [18].van Es JH, Sato T, van de Wetering M, Lyubimova A, Nee ANY, Gregorieff A, Sasaki N, Zeinstra L, van den Born M, Korving J, Martens ACM, Barker N, van Oudenaarden A, Clevers H (2012) Dll1(+) secretory progenitor cells revert to stem cells upon crypt damage. *Nat Cell Biol* 14(10):1099
- [19].Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, Barker N, Shroyer NF, van de Wetering M, Clevers H (2011) Paneth cells constitute

- D, Muthuswamy L, Krasnitz A, McCombie WR, Hicks J, Wigler M(2011)
- 2. Stem cells: past, present, and future: Wojciech Zakrzewski^{1*}, Maciej Dobrzyński², Maria Szymonowicz¹ and Zbigniew Rybak:**
- [1]. Sukoyan MA, Vatolin SY, et al. Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies. *Embryo Dev.* 1993;36(2):148–58
 - [2]. Larijani B, Esfahani EN, Amini P, Nikbin B, Alimoghaddam K, Amiri S, Malekzadeh R, Yazdi NM, Ghodsi M, Dowlati Y, Sahraian MA, Ghavamzadeh A. Stem cell therapy in treatment of different diseases. *Acta Medica Iranica.* 2012;79–96 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22359076>.
 - [3]. Sullivan S, Stacey GN, Akazawa C, et al. Quality guidelines for clinical-grade human induced pluripotent stem cell lines. *Regenerative Med.* 2018; <https://doi.org/10.2217/rme-2018-0095>.
 - [4]. Amps K, Andrews PW, et al. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat. Biotechnol.* 2011;29(12):1121–44.
 - [5]. Amit M, Itskovitz-Eldor J. Atlas of human pluripotent stem cells: derivation and culturing. New York: Humana Press; 2012.
 - [6]. Ludwig TE, Bergendahl V, Levenstein ME, Yu J, Probasco MD, Thomson JA. Feeder-independent culture of human embryonic stem cells. *Nat Methods.* 2006; 3:637–46.
 - [7]. Kang MI. Transitional CpG methylation between promoters and retroelements of tissue-specific genes during human mesenchymal cell differentiation. *J. Cell Biochem.* 2007; 102:224–39.
 - [8]. Vaes B, Craeye D, Pinxteren J. Quality control during manufacture of a stem cell therapeutic. *BioProcess Int.* 2012; 10:50–5.
 - [9]. Bloushtain-Qimron N. Epigenetic patterns of embryonic and adult stem cells. *Cell Cycle.* 2009; 8:809–17.
 - [10]. Brindley DA. Peak serum: implications of serum supply for cell therapy manufacturing. *Regenerative Medicine.* 2012; 7:809–17.
 - [11]. Solter D, Knowles BB. Immunosurgery of mouse blastocyst. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975; 72:5099–102.
 - [12]. Hoepfl G, Gassmann M, Desbaillets I. Differentiating embryonic stem cells into embryoid bodies. *Methods Mole Biol.* 2004; 254:79–98 <https://doi.org/10.1385/1-59259-741-6:079>.
 - [13]. Lim WF, Inoue-Yokoo T, Tan KS, Lai MI, Sugiyama D. Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(3):71. <https://doi.org/10.1186/scrt222>.
 - [14]. Mohr JC, de Pablo JJ, Palecek SP. 3-D microwell culture of human embryonic stem cells. mouse pluripotent stem cell- derived skin organoids. *Cell Rep* 22(1):242–254
 - [33]. Takagi R, Ishimaru J, Sugawara A, Toyoshima K, Ishida K, Ogawa M, Sakakibara K, Asakawa K, Kashiwakura A, Oshima M, Minamide R, Sato A, Yoshitake T, Takeda A, Egusa H, Tsuji T (2016) Bioengineering a 3D integumentary organ system from iPS cells using an in vivo transplantation model. *Sci Adv* 2(4):e1500887
 - [34]. Furth JK (1937) The transmission of leukemia of mice with a single cell. *Am J Cancer* 31:276–282
 - [35]. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres- Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE (1994) A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367(6464):645–648
 - [36]. Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH (2000) Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407(6800):86–90
 - [37]. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5):861–872
 - [38]. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo HG, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ (2008) Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451(7175):141–U141
 - [39]. Driessens G, Beck B, Caauwe A, Simons BD, Blanpain C (2012) Defining the mode of tumour growth by clonal analysis. *Nature* 488(7412):527
 - [40]. Kozar S, Morrissey E, Nicholson AM, van der Heijden M, Zecchini HI, Kemp R, Tavare S, Vermeulen L, Winton DJ (2013) Continuous clonal labeling reveals small numbers of functional stem cells in intestinal crypts and adenomas. *Cell Stem Cell* 13(5):626–633
 - [41]. Schepers AG, Snippert HJ, Stange DE, van den Born M, van Es JH, van de Wetering M, Clevers H (2012) Lineage tracing reveals Lgr5(+) stem cell activity in mouse intestinal adenomas. *Science* 337(6095):730–735
 - [42]. Eirew P, Steif A, Khattri J, Ha G, Yap D, Farhani H, Gelmon K, Chia S, Mar C, Wan A, Laks E, Biele J, Shumansky K, Rosner J, McPherson A, Nielsen C, Roth AJL, Lefebvre C, Bashashati A, de Souza C, Siu C, Aniba R, Brimhall J, Oloumi A, Osako T, Bruna A, Sandoval JL, Algara T, Greenwood W, Leung K, Cheng HW, Xue H, Wang YZ, Lin D, Mungall AJ, Moore R, Zhao YJ, Lorette J, Nguyen L, Huntsman D, Eaves CJ, Hansen C, Marra MA, Caldas C, Shah SP, Aparicio S (2015) Dynamics of genomic clones in breast cancer patient xenografts at single-cell resolution. *Nature* 518(7539):422–426
 - [43]. Navin N, Kendall J, Troge J, Andrews P, Rodgers L, McIndoo J, Cook K, Stepansky A, Levy D, Esposito

- [26].Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, Takahashi JB, Nishikawa S, Nishikawa S, Muguruma K, Sasai Y. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2007; 25:681–6.
- [27].Nie Y, Walsh P, Clarke DL, Rowley JA, Fellner T. Scalable passaging of adherent human pluripotent stem cells. 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088012>.
- [28].Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; 282:1145–7.
- [29].Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A. Human embryonic stem cellsexpress an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat. Med.* 2005; 11:228–32.
- [30].Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature.* 1988;336(6200):688–90. <https://doi.org/10.1038/336688a0>.
- [31].Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnol.*2001;19:971–4. <https://doi.org/10.1038/nbt1001-971>.
- [32].Weathersbee PS, Pool TB, Ord T. Synthetic serum substitute (SSS): a globulin-enriched protein supplement for human embryo culture. *J. Assist Reprod Genet.* 1995; 12:354–60.
- [33].Chen G, Gulbranson DR, Hou Z, Bolin JM, Ruotti V, Probasco MD, Smuga- Otto K, Howden SE, Diol NR, Propson NE, Wagner R, Lee GO, Antosiewicz-Bourget J, Teng JM, Thomson JA. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat. Methods.* 2011; 8:424–9.
- [34].Sommer CA, Mostoslavsky G. Experimental approaches for the generation of induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2010; 1:26.
- [35].Takahashi K, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development.* 2013;140(12):2457–61 <https://doi.org/10.1242/dev.092551>.
- [36].Shi D, Lu F, Wei Y, et al. Buffalos (*Bubalus bubalis*) cloned by nuclear transfer of somatic cells. *Biol. Reprod.* 2007; 77:285–91. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.060210>.
- [37].Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Development.* 1962; 10:622–40 <http://dev.biologists.org/content/10/4/622>.
- [38].Kain K. The birth of cloning: an interview with John Gurdon. *Dis Model Mech.* 2009;2(1–2):9–10. <https://doi.org/10.1242/dmm.002014>.
- Biomaterials.2006;27(36):6032–42. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.07.012>.
- [15].Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of the visceral yolk sac, blood islands, and myocardium. *J Embryol Exp Morphol.* 1985; 87:27–45.
- [16].Kurosawa HY. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng.* 2007.98–103:389 ;
- [17].Heins N, Englund MC, Sjoblom C, Dahl U, Tønning A, Bergh C, Lindahl A, Hanson C, Semb H. Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2004; 22:367–76.
- [18].Rosowski KA, Mertz AF, Norcross S, Dufresne ER, Horsley V. Edges of human embryonic stem cell colonies display distinct mechanical properties and differentiation potential. *Sci Rep.* 2015;5: Article number:14218.
- [19].Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Li T, Maserati M, Lu SJ, Zdravkovic T, Ilic D, Genbacev O, Fisher S, Krtolica A, Lanza R. Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell.* 2008; 2:113–7.
- [20].Zhang X, Stojkovic P, Przyborski S, Cooke M, Armstrong L, Lako M, Stojkovic M. Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos. *Stem Cells.* 2006; 24:2669–76.
- [21].Beers J, Gulbranson DR, George N, Siniscalchi LI, Jones J, Thomson JA, Chen G. Passaging and colony expansion of human pluripotent stem cells by enzyme-free dissociation in chemically defined culture conditions. *Nat Protoc.* 2012; 7:2029–40.
- [22].Ellerström C, Hyllner J, Strehl R. single cell enzymatic dissociation of human embryonic stem cells: a straightforward, robust, and standardized culture method. In: Turksen K, editor. *Human embryonic stem cell protocols. Methods in molecular biology: Humana Press;* 2009. p. 584.
- [23].Heng BC, Liu H, Ge Z, Cao T. Mechanical dissociation of human embryonic stem cell colonies by manual scraping after collagenase treatment is muchmore detrimental to cellular viability than is trypsinization with gentle pipetting. *Biotechnol Appl Biochem.* 2010;47(1):33–7.
- [24].Ellerstrom C, Strehl R, Noaksson K, Hyllner J, Semb H. Facilitated expansion of human embryonic stem cells by single-cell enzymatic dissociation. *Stem Cells.* 2007; 25:16906.
- [25].Brimble SN, Zeng X, Weiler DA, Luo Y, Liu Y, Lyons IG, Freed WJ, Robins AJ, Rao MS, Schulz TC. Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines deri. *Stem Cells Dev.* 2004; 13:585–97.

- embryonic stem cells- platforms for future clinical applications. PLoS One. 2012;7:e35325.
- [51].Cohen DE, Melton D. Turning straw into gold: directing cell fate for regenerative medicine. Nat Rev Genet. 2011;12:243–52.
- [52].Hwang NS, Varghese S, Elisseeff J. Controlled differentiation of stem cells. Adv Drug Deliv Rev. 2007;60(2):199–214.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.08.036>.
- [53].Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. Nat Rev Cancer. 2010;10:116–29.
- [54].Rao TP, Kuhl M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. Circ Res. 2010;106:1798–806.
- [55].Moustakas A, Heldin CH. The regulation of TGFbeta signal transduction. Development. 2009;136:3699–714.
- [56].Efthymiou AG, Chen G, Rao M, Chen G, Boehm M. Self-renewal and cell lineage differentiation strategies in human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. Expert Opin Biol Ther. 2014;14:1333–44.
- [57].Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, Roepke TK, Kattman SJ, Kennedy M, Henckaerts E, Bonham K, Abbott GW, Linden RM, Field LJ, Keller GM. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR β embryonic-stem-cell- derived population. Nature. 2008;453:524–8.
- [58].Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Agulnick AD, D'amour KA, Carpenter MK, Baetge EE. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. Nat Biotechnol. 2008;26(4):443–52.
<https://doi.org/10.1038/nbt1393>.
- [59].Vallier L, Reynolds D, Pedersen RA. Nodal inhibits differentiation of human embryonic stem cells along the neuroectodermal default pathway. Dev Biol. 2004;275:403–21.
- [60].Burridge PW, Zambidis ET. Highly efficient directed differentiation of human induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes. Methods Mol Biol. 2013;997:149–61.
- [61].Cai J, Zhao Y, Liu Y, Ye F, Song Z, Qin H, Meng S, Chen Y, Zhou R, Song X, Guo Y, Ding M, Deng H. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. Hepatology. 2007;45:1229–39.
- [62].Takasato M, Er PX, Becroft M, Vanslambrouck JM, Stanley EG, Elefanty AG, Little MH. Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a selforganizing kidney. Nat Cell Biol. 2014;16:118–26.
- [63].Huang SX, Islam MN, O'Neill J, Hu Z, Yang YG, Chen YW, Mumau M, Green MD, VunjakNovakovic [39].Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. Cell. 1987;24(51(6)):987–1000.
- [40].Quinlan AR, Boland MJ, Leibowitz ML, et al. Genome sequencing of mouse induced pluripotent stem cells reveals retroelement stability and infrequent DNA rearrangement during reprogramming. Cell Stem Cell. 2011;9(4):366–73.
- [41].Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utika LJ, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, Plath K, Hochedlinger K. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. Cell Stem Cell. 2007; 1:55–70.
- [42].Ohi Y, Qin H, Hong C, Blouin L, Polo JM, Guo T, Qi Z, Downey SL, Manos PD, Rossi DJ, Yu J, Hebrok M, Hochedlinger K, Costello JF, Song JS, Ramalho-Santos M. Incomplete DNA methylation underlines a transcriptional memory of somatic cells in human IPS cells. Nat Cell Biol. 2011; 13:541–9.
- [43].Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. Nature. 2008; 455:627–32
<https://doi.org/10.1038/nature07314>.
- [44].Hilfiker A, Kasper C, Hass R, Haverich A. Mesenchymal stem cells and progenitor cells in connective tissue engineering and regenerative medicine: is there a future for transplantation? Langenbecks Arch Surg. 2011;396:489–97.
- [45].Zhang Wendy, Y., de Almeida Patricia, E., and Wu Joseph, C. Teratoma formation: a tool for monitoring pluripotency in stem cell research. StemBook, ed. The Stem Cell Research Community. June 12, 2012.
<https://doi.org/10.3824/stembook.1.53.1>.
- [46].Narsinh KH, Sun N, Sanchez-Freire V, et al. Single cell transcriptional profiling reveals heterogeneity of human induced pluripotent stem cells. J Clin Invest. 2011;121(3):1217–21.
- [47].Gertow K, Przyborski S, Loring JF, Auerbach JM, Epifano O, Otonkoski T, Damjanov I, AhrlundRichter L. Isolation of human embryonic stem cell- derived teratomas for the assessment of pluripotency. Curr Protoc Stem Cell Biol. 2007, Chapter 1, Unit 1B 4. 3: 1B.4.1-1B.4.29.
- [48].Cooke MJ, Stojkovic M, Przyborski SA. Growth of teratomas derived from human pluripotent stem cells is influenced by the graft site. Stem Cells Dev. 2006;15(2):254–9.
- [49].Przyborski SA. Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immune-deficient mice. Stem Cells. 2005;23:1242–50.
- [50].Tannenbaum SE, Turetsky TT, Singer O, Aizenman E, Kirshberg S, Ilouz N, Gil Y, Berman-Zaken Y, Perlman TS, Geva N, Levy O, Arbell D, Simon A, Ben-Meir A, Shufaro Y, Laufer N, Reubinoff BE. Derivation of xeno-free and GMP-grade human

- [10]. D. Yang, W. Zhang, H. Zhang, F. Zhang, L. Chen, L. Ma, L.M. Larcher, S. Chen,
[11]. N. Liu, Q. Zhao, P.H.L. Tran, C. Chen, R.N. Veedu, T. Wang, Progress, opportunity, and perspective on exosome isolation - efforts for efficient exosome-based theranostics, *Theranostics* 10 (8) (2020) 3684–3707.

4.Recent Progress of Stem Cell Therapy in Cancer Treatment: Molecular Mechanisms and Potential Applications

- [1]. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J. Clin.* 2016, 66, 7–30. [CrossRef] [PubMed]
[2]. Vasievich, E.A.; Huang, L. The Suppressive Tumor Microenvironment: A Challenge in Cancer Immunotherapy.
[3]. Mol. Pharm. 2011, 8, 635–641. [CrossRef] [PubMed] Vanneman, M.; Dranoff, G. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer* 2012, 12, 237–251. [CrossRef] [PubMed]
[4]. Young, A.; Quandt, Z.; Bluestone, J.A. The Balancing Act between Cancer Immunity and Autoimmunity in Response to Immunotherapy. *Cancer Immunol. Res.* 2018, 6, 1445–1452. [CrossRef]
[5]. Gomes, J.P.; Assoni, A.F.; Pelatti, M.; Coatti, G.; Okamoto, O.K.; Zatz, M. Deepening a Simple Question: Can MSCs Be Used to Treat Cancer? *Anticancer Res.* 2017, 37, 4747–4758.
[6]. Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 2006, 126, 663–676. [CrossRef]
[7]. Knorr, D.A.; Ni, Z.; Hermanson, D.; Hexum, M.K.; Bendzick, L.; Cooper, L.J.; Lee, D.-J.; Kaufman, D.S. Clinical-Scale Derivation of Natural Killer Cells From Human Pluripotent Stem Cells for Cancer Therapy. *Stem Cells Transl. Med.* 2013, 2, 274–283. [CrossRef]
[8]. Li, Y.; Hermanson, D.L.; Moriarty, B.S.; Kaufman, D.S. Human iPSC-Derived Natural Killer Cells Engineered with Chimeric Antigen Receptors Enhance Anti-tumor Activity. *Cell Stem Cell* 2018, 23, 181–192.e5. [CrossRef]
[9]. Ruella, M.; Kenderian, S.S. Next-Generation Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy: Going off the Shelf. *BioDrugs* 2017, 31, 473–481. [CrossRef] [PubMed]
[10]. Timmermans, F.; Velghe, I.; Vanwalleghem, L.; De Smedt, M.; Van Coppennolle, S.; Taghon, T.; Moore, H.D.; Leclercq, G.; Langerak, A.W.; Kerre, T.; et al. Generation of T Cells from Human Embryonic Stem Cell-Derived Hematopoietic Zones. *J. Immunol.* 2009, 182, 6879–6888. [CrossRef] [PubMed]
[11]. Kooreman, N.G.; Kim, Y.; De Almeida, P.; Termglinchan, V.; Diecke, S.; Shao, N.; Wei, T.; Yi, H.; Dey, D.; Nelakanti, R.; et al. Autologous iPSC-Based Vaccines Elicit Anti-tumor Responses In Vivo.

G, Bhattacharya J, Snoeck HW. Efficient generation of lung and airway epithelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2014; 32:84–91.

- [64]. Kadzik RS, Morrissey EE. Directing lung endoderm differentiation in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2012; 10:355–61.
[65]. Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell.* 2002; 110:385–97.
[66]. Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, Kuhar MF, Vallance JE, Tolle K, Hoskins EE, Kalinichenko VV, Wells SI, Zorn AM, Shroyer NF, Wells JM. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature.* 2011; 470:105–9.
[67]. Oldershaw RA, Baxter MA, Lowe ET, Bates N, Grady LM, Soncin F, Brison DR, Hardingham TE, Kimber SJ. Directed differentiation of human embryonic stem cells toward chondrocytes. *Nat Biotechnol.* 2010; 28:1187–94

3. Importance of stem cell culture conditions for their derived extracellular vesicles therapeutic effect

- [1]. K. Sidhom, P.O. Obi, A. Saleem, A review of exosomal isolation methods: is size exclusion chromatography the best option? *Int. J. Mol. Sci.* 21 (18)(2020)
[2]. C. Chen, J. Skog, C.H. Hsu, R.T. Lessard, L. Balaj, T. Wurdinger, B.S. Carter, X.O. Breakefield, M. Toner, D. Irimia, Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles, *Lab Chip* 10 (4) (2010) 505–511.
[3]. F. Yang, X. Liao, Y. Tian, G. Li, Exosome separation using microfluidic systems: size-based, immunoaffinity-based and dynamic methodologies, *Biotechnol. J.* 12 (4).(2017) (
[4]. K. Lee, H. Shao, R. Weissleder, H. Lee, Acoustic purification of extracellular microvesicles, *ACS Nano* 9 (3) (2015) 2321–2327.
[5]. X. Li, A.L. Corbett, E. Taatizadeh, N. Tasnim, J.P. Little, C. Garnis, M. Daugaard, E. Guns, M. Hoorfar, I.T.S. Li, Challenges and opportunities in exosome research- Perspectives from biology, engineering, and cancer therapy, *APL Bioeng* 3 (1) (2019), 011503.
[6]. H.K. Woo, V. Sunkara, J. Park, T.H. Kim, J.R. Han, C.J. Kim, H.I. Choi, Y.K. Kim, Y.
[7]. K. Cho, Exodisc for rapid, size-selective, and efficient isolation and analysis of nanoscale extracellular vesicles from biological samples, *ACS Nano* 11 (2) (2017) 1360–1370.
[8]. S.S. Kanwar, C.J. Dunlay, D.M. Simeone, S. Nagrah, Microfluidic device (ExoChip) for on-chip isolation, quantification and characterization of circulating exosomes, *Lab Chip* 14 (11) (2014) 1891–1900.
[9]. Z. Zhao, Y. Yang, Y. Zeng, M. He, A microfluidic ExoSearch chip for multiplexed exosome detection towards blood-based ovarian cancer diagnosis, *Lab Chip* 16 (3) (2016) 489–496.

- migration. *Blood* 2006, 109, 533–542. [CrossRef] [PubMed]
- [24]. Adams, G.B.; Chabner, K.T.; Alley, I.R.; Olson, D.P.; Szczepiorkowski, Z.M.; Poznansky, M.C.; Kos, C.H.; Pollak, M.R.; Brown, E.M.; Scadden, D.T. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature* 2005, 439, 599–603. [CrossRef] [PubMed]
- [25]. Okajima, F. Regulation of inflammation by extracellular acidification and proton-sensing GPCRs. *Cell. Signal.* 2271–2263, 25, 2013 [CrossRef] [PubMed]
- [26]. Lapidot, T.; Dar, A.; Kollet, O. How do stem cells find their way home? *Blood* 2005, 106, 1901–1910. [CrossRef]
- [27]. Wang, H.; Cao, F.; De, A.; Cao, Y.; Contag, C.H.; Gambhir, S.S.; Wu, J.C.; Chen, X. Trafficking mesenchymal stem cell engraftment and differentiation in tumor-bearing mice by bioluminescence imaging. *Stem Cells* 2009, 27, 1548–1558. [CrossRef]
- [28]. Pattabiraman, D.; Weinberg, R.A. Tackling the cancer stem cells—What challenges do they pose? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2014, 13, 497–512. [CrossRef]
- [29]. Flier, J.S.; Underhill, L.H.; Dvorak, H.F. Tumors: Wounds That Do Not Heal. *N. Engl. J. Med.* 1986, 315, 1650–1659. [CrossRef]
- [30]. Jiang, Y.; Wells, A.; Sylakowski, K.; Clark, A.; Ma, B. Adult Stem Cell Functioning in the Tumor Micro-Environment. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 2566. [CrossRef]
- [31]. Sun, Z.; Wang, S.; Zhao, R.C. The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *J. Hematol. Oncol.* 2014, 7, 14. [CrossRef] [PubMed]
- [32]. Jung, Y.; Kim, J.K.; Shiozawa, Y.; Wang, J.; Mishra, A.; Joseph, J.; Berry, J.E.; McGee, S.; Lee, E.; Sun, H.; et al. Recruitment of mesenchymal stem cells into prostate tumours promotes metastasis. *Nat. Commun.* 2013, 4, 1795. [CrossRef] [PubMed]
- [33]. Rattigan, Y.; Hsu, J.-M.; Mishra, P.J.; Glod, J.; Banerjee, D. Interleukin 6 mediated recruitment of mesenchymal stem cells to the hypoxic tumor milieu. *Exp. Cell Res.* 2010, 316, 3417–3424. [CrossRef] [PubMed]
- [34]. Xu, W.-T.; Bian, Z.-Y.; Fan, Q.-M.; Li, G.; Tang, T. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis. *Cancer Lett.* 2009, 281, 32–41. [CrossRef] [PubMed]
- [35]. Xu, S.; Menu, E.; De Becker, A.; Van Camp, B.; Vanderkerken, K.; Van Riet, I. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells are Attracted by Multiple Myeloma Cell-Produced Chemokine CCL25 and Favor Myeloma Cell Growth in Vitro and In Vivo. *Stem Cells* 2012, 30, 266–279. [CrossRef]
- Cell Stem Cell 2018, 22, 501–513.e7. [CrossRef] [PubMed]
- [12]. Ouyang, X.; Telli, M.L.; Wu, J.C. Induced Pluripotent Stem Cell-Based Cancer Vaccines. *Front. Immunol.* 2019, 10, 1510. [CrossRef] [PubMed]
- [13]. Copelan, E.A. Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *N. Engl. J. Med.* 2006, 354, 1813–1826. [CrossRef] [PubMed]
- [14]. Christodoulou, I.; Goulielmaki, M.; Devetzi, M.; Panayiotidis, M.I.; Koliakos, G.; Zoumpourlis, V. Mesenchymal stem cells in preclinical cancer cytottherapy: A systematic review. *Stem Cell Res. Ther.* 2018, 9, 336. [CrossRef] [PubMed]
- [15]. Lin, W.; Huang, L.; Li, Y.; Fang, B.; Li, G.; He, W.; Xu, L. Mesenchymal Stem Cells and Cancer: Clinical Challenges and Opportunities. *BioMed Res. Int.* 2019, 2019, 2820853–12. [CrossRef] [PubMed]
- [16]. Kanojia, D.; Balyasnikova, I.V.; Morshed, R.A.; Frank, R.T.; Yu, D.; Zhang, L.; Spencer, E.A.; Kim, J.W.; Han, Y.; Yu, D.; et al. Neural Stem Cells Secreting Anti-HER2 Antibody Improve Survival in a Preclinical Model of HER2 Overexpressing Breast Cancer Brain Metastases. *Stem Cells* 2015, 33, 2985–2994. [CrossRef]
- [17]. Lee, H.J.; Doo, S.W.; Kim, D.H.; Cha, Y.J.; Kim, J.H.; Song, Y.S.; Kim, S.U. Cytosine deaminase-expressing human neural stem cells inhibit tumor growth in prostate cancer-bearing mice. *Cancer Lett.* 2013, 335, 58–65. [CrossRef]
- [18]. Yi, B.-R.; Kim, S.U.; Choi, K.-C. Co-treatment with therapeutic neural stem cells expressing carboxyl esterase and CPT-11 inhibit growth of primary and metastatic lung cancers in mice. *Oncotarget* 2014, 5, 12835–12848. [CrossRef]
- [19]. Chang, J.C. Cancer stem cells: Role in tumor growth, recurrence, metastasis, and treatment resistance. *Medicine* 2016, 95 (Suppl. 1). [CrossRef]
- [20]. Seitz, G.; Boehmler, A.M.; Kanz, L.; Möhle, R. The Role of Sphingosine 1-Phosphate Receptors in the Trafficking of Hematopoietic Progenitor Cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005, 1044, 84–89. [CrossRef]
- [21]. Massberg, S.; Von Andrian, U.H. Novel trafficking routes for hematopoietic stem and progenitor cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009, 1176, 87–93. [CrossRef] [PubMed]
- [22]. Juarez, J.G.; Harun, N.; Thien, M.; Welschinger, R.; Baraz, R.; Pena, A.D.; Pitson, S.M.; Rettig, M.; DiPersio, J.F.; Bradstock, K.F.; et al. Sphingosine-1-phosphate facilitates trafficking of hematopoietic stem cells and their mobilization by CXCR4 antagonists in mice. *Blood* 2012, 119, 707–716. [CrossRef] [PubMed]
- [23]. Rossi, L.; Manfredini, R.; Bertolini, F.; Ferrari, D.; Fogli, M.; Zini, R.; Salati, S.; Salvestrini, V.; Gulinelli, S.; Adinolfi, E.; et al. The extracellular nucleotide UTP is a potent inducer of hematopoietic stem cell

- Treosulfan/Fludarabine Conditioning. *J. Clin. Oncol.* 2010, 28, 3344–3351. [CrossRef] [PubMed]
- [51]. Le Blanc, K.; Ringdén, O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J. Intern. Med.* 2007, 262, 509–525. [CrossRef] [PubMed]
- [52]. Sacchetti, B.; Funari, A.; Michienzi, S.; Di Cesare, S.; Piersanti, S.; Saggio, I.; Tagliafico, E.; Ferrari, S.; Robey, P.; Riminucci, M.; et al. Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. *Cell* 2007, 131, 324–336. [CrossRef] [PubMed]
- [53]. Méndez-Ferrer, S.; Michurina, T.V.; Ferraro, F.; Mazloom, A.R.; MacArthur, B.; Lira, S.A.; Scadden, D.T.; Ma'Ayan, A.; Enikolopov, G.N.; Frenette, P.S. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 2010, 466, 829–834. [CrossRef] [PubMed]
- [54]. Jurado, M.; De La Mata, C.; Ruiz-García, A.; López-Fernández, E.; Espinosa, O.; Remigia, M.J.; Moratalla, L.; Gotteris, R.; García-Martín, P.; Ruiz-Cabello, F.; et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells as part of therapy for chronic graft-versus-host disease: A phase I/II study. *Cytherapy* 2017, 19, 927–936. [CrossRef]
- [55]. Muroi, K.; Miyamura, K.; Okada, M.; Yamashita, T.; Murata, M.; Ishikawa, T.; Uike, N.; Hidaka, M.; Kobayashi, R.; Imamura, M.; et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (JR-031) for steroid-refractory grade III or IV acute graft-versus-host disease: A phase II/III study. *Int. J. Hematol.* 2015, 103, 243–250. [CrossRef] [PubMed]
- [56]. Yin, F.; Battiwalla, M.; Ito, S.; Feng, X.; Chinian, F.; Melenhorst, J.J.; Koklanaris, E.; Sabatino, M.; Stroncek, D.; Samsel, L.; et al. Bone marrow mesenchymal stromal cells to treat tissue damage in allogeneic stem cell transplant recipients: Correlation of biological markers with clinical responses. *Stem Cells* 2014, 32, 1278–1288. [CrossRef]
- [57]. Baron, F.; Lechanteur, C.; Willems, E.; Bruck, F.; Baudoux, E.; Seidel, L.; Vanbellinghen, J.-F.; Hafraoui, K.; Lejeune, M.; Gothot, A.; et al. Cotransplantation of Mesenchymal Stem Cells Might Prevent Death from Graft-versus-Host Disease (GVHD) without Abrogating Graft-versus-Tumor Effects after HLA-Mismatched Allogeneic Transplantation following Nonmyeloablative Conditioning. *Boil. Blood Marrow Transplant.* 2010, 16, 838–847. [CrossRef]
- [58]. Zhou, H.; Guo, M.; Bian, C.; Sun, Z.; Yang, Z.; Zeng, Y.; Ai, H.-S.; Zhao, R.C. Efficacy of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Sclerodermatous Chronic Graft-versus-Host Disease: Clinical Report. *Boil. Blood Marrow Transplant.* 2010, 16, 403–412. [CrossRef]
- [59]. Sage, E.; Thakrar, R.M.; Janes, S.M. Genetically modified mesenchymal stromal cells in cancer therapy. [36]. Sullivan, C.B.; Porter, R.M.; Evans, C.H.; Ritter, T.; Shaw, G.; Barry, F.P.; Murphy, M. TNF α and IL-1 β influence the differentiation and migration of murine MSCs independently of the NF- κ B pathway. *Stem Cell Res. Ther.* 2014, 5, 104. [CrossRef]
- [37]. Uchibori, R.; Tsukahara, T.; Mizuguchi, H.; Saga, Y.; Urabe, M.; Mizukami, H.; Kume, A.; Ozawa, K. NF- κ B Activity Regulates Mesenchymal Stem Cell Accumulation at Tumor Sites. *Cancer Res.* 2012, 73, 364–372. [CrossRef]
- [38]. Vakhshiteh, F.; Atyabi, F.; Ostad, S.N. Mesenchymal stem cell exosomes: A two-edged sword in cancer therapy. *Int. J. Nanomed.* 2019, 14, 2847–2859. [CrossRef]
- [39]. Lee, R.H.; Oh, J.Y.; Choi, H.; Bazhanov, N. Therapeutic factors secreted by mesenchymal stromal cells and tissue repair. *J. Cell. Biochem.* 2011, 112, 3073–3078. [CrossRef]
- [40]. Reddy, R.L. Mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells for transplantation. *Transfus. Apher. Sci.* 2005, 32, 63–72. [CrossRef]
- [41]. Matsui, W.H. Cancer stem cell signaling pathways. *Medicine* 2016, 95, S8–S19. [CrossRef] [PubMed]
- [42]. Jordan, C.T.; Guzman, M.L.; Noble, M. Cancer stem cells. *N. Engl. J. Med.* 2006, 355, 1253–1261. [CrossRef] [PubMed]
- [43]. O'Brien, C.; Kreso, A.; Jamieson, C.H.M. Cancer Stem Cells and Self-renewal. *Clin. Cancer Res.* 2010, 16, 3113–3120. [CrossRef] [PubMed]
- [44]. Cojoc, M.; Mäbert, K.; Munders, M.H.; Dubrovskaya, A. A role for cancer stem cells in therapy resistance: Cellular and molecular mechanisms. *Semin. Cancer Biol.* 2015, 31, 16–27. [CrossRef]
- [45]. Batlle, E.; Clevers, H. Cancer stem cells revisited. *Nat. Med.* 2017, 23, 1124–1134. [CrossRef] [PubMed]
- [46]. Codd, A.S.; Kanaseki, T.; Torigo, T.; Tabi, Z. Cancer stem cells as targets for immunotherapy. *Immunology* 2017, 153, 314–304. [CrossRef] [PubMed]
- [47]. Toledo-Guzmán, M.E.; Bigoni-Ordóñez, G.D.; Ibáñez-Hernández, M.; Ortiz-Sánchez, E. Cancer stem cell impact on clinical oncology. *World J. Stem Cells* 2018, 10, 183–195.
- [48]. Al-Hajj, M. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 3983–3988. [CrossRef] [PubMed]
- [49]. Croker, A.; Goodale, D.; Chu, J.; Postenka, C.; Hedley, B.D.; Hess, D.A.; Allan, A. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J. Cell. Mol. Med.* 2008, 13, 2236–2252. [CrossRef] [PubMed]
- [50]. Casper, J.; Wolff, D.; Knauf, W.; Blau, I.W.; Ruutu, T.; Volin, L.; Wandt, H.; Schäfer-Eckart, K.; Holowiecki, J.; Giebel, S.; et al. Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation in Patients With Hematologic Malignancies After Dose-Escalated

- of cancer therapeutics. *Nat. Commun.* 2018, 9, 1410. [CrossRef]
- [71]. Behzadi, S.; Serpooshan, V.; Tao, W.; Hamaly, M.A.; Alkawareek, M.; Dreaden, E.; Brown, D.; Alkilany, A.; Farokhzad, O.C.; Mahmoudi, M. Cellular uptake of nanoparticles: Journey inside the cell. *Chem. Soc. Rev.* 2017, 46, 4218–4244. [CrossRef] [PubMed]
- [72]. Roger, M.; Clavreul, A.; Venier-Julienne, M.-C.; Passirani, C.; Sindji, L.; Schiller, P.; Montero-Menei, C.; Menei, P. Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for delivery of nanoparticles to brain tumors. *Biomaterials* 2010, 31, 8393–8401. [CrossRef] [PubMed]
- [73]. Layek, B.; Sadhukha, T.; Panyam, J.; Prabha, S. Nano-Engineered Mesenchymal Stem Cells Increase Therapeutic Efficacy of Anticancer Drug Through True Active Tumor Targeting. *Mol. Cancer Ther.* 2018, 17, 1196–1206. [CrossRef] [PubMed]
- [74]. Lee, R.H.; Pulin, A.; Seo, M.J.; Kota, D.J.; Ylostalo, J.; Larson, B.L.; Semprun-Prieto, L.; Delafontaine, P.; Prockop, D.J. Intravenous hMSCs Improve Myocardial Infarction in Mice because Cells Embolized in Lung Are Activated to Secrete the Anti-inflammatory Protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 2009, 5, 54–63. [CrossRef] [PubMed]
- [75]. Wang, X.; Chen, H.; Zeng, X.; Guo, W.; Jin, Y.; Wang, S.; Tian, R.; Han, Y.; Guo, L.; Han, J.; et al. Efficient lung cancer-targeted drug delivery via a nanoparticle/MSC system. *Acta Pharm. Sin. B* 2018, 9, 167–176. [CrossRef] [PubMed]
- [76]. Moku, G.; Layek, B.; Trautman, L.; Putnam, S.; Panyam, J.; Prabha, S. Improving Payload Capacity and Anti-Tumor Efficacy of Mesenchymal Stem Cells Using TAT Peptide Functionalized Polymeric Nanoparticles. *Cancers* 2019, 11, 491. [CrossRef] [PubMed]
- [77]. Cheng, H.; Kastrup, C.J.; Ramanathan, R.; Siegwart, D.J.; Ma, M.; Bogatyrev, S.R.; Xu, Q.; Whitehead, K.A.; Langer, R.; Anderson, D.G. Nanoparticulate Cellular Patches for Cell-Mediated Tumor-tropic Delivery. *ACS Nano* 2010, 4, 625–631. [CrossRef]
- Cytherapy 2016, 18, 1435–1445. [CrossRef]
- [60]. Malekshah, O.M.; Chen, X.; Nomani, A.; Sarkar, S.; Hatefi, A. Enzyme/Prodrug Systems for Cancer Gene Therapy. *Curr. Pharmacol. Rep.* 2016, 2, 299–308. [CrossRef]
- [61]. Kucerova, L.; Matuskova, M.; Pastorakova, A.; Tyciakova, S.; Jakubikova, J.; Bohovic, R.; Altanerova, V.; Altaner, C. Cytosine deaminase expressing human mesenchymal stem cells mediated tumour regression in melanoma bearing mice. *J. Gene Med.* 2008, 10, 1071–1082. [CrossRef] [PubMed]
- [62]. Chang, D.-Y.; Yoo, S.-W.; Hong, Y.; Kim, S.; Kim, S.J.; Yoon, S.-H.; Cho, K.-G.; Paek, S.H.; Lee, Y.-D.; Kim, S.-S.; et al. The growth of brain tumors can be suppressed by multiple transplantation of mesenchymal stem cells expressing cytosine deaminase. *Int. J. Cancer* 2010, 127, 1975–1983. [CrossRef] [PubMed]
- [63]. Gutova, M.; Goldstein, L.; Metz, M.; Hovsepian, A.; Tsurkan, L.G.; Tirughana, R.; Tsaturyan, L.; Annala, A.; Synold, T.W.; Wan, Z.; et al. Optimization of a Neural Stem-Cell-Mediated Carboxylesterase/Irinotecan Gene Therapy for Metastatic Neuroblastoma. *Mol. Ther. Oncolytics* 2016, 4, 67–76. [CrossRef] [PubMed]
- [64]. Choi, S.S.; Yoon, K.; Choi, S.-A.; Yoon, S.-B.; Kim, S.U.; Lee, H.J. Tumor-specific gene therapy for pancreatic cancer using human neural stem cells encoding carboxylesterase. *Oncotarget* 2016, 7, 75319–75327. [CrossRef]
- [65]. Von Einem, J.C. Treatment of advanced gastrointestinal cancer with genetically modified autologous mesenchymal stem cells: Results from the Phase 1/2 TREAT-ME-1 Trial. *Int. J. Cancer* 2019. [CrossRef]
- [66]. Jobst, C. Treatment of advanced gastrointestinal cancer with genetically modified autologous mesenchymal stem cells-TREAT-ME-1-a phase I, first in human, first in class trial. *Oncotarget* 2017, 8, 80156.
- [67]. Kauer, T.M.; Figueiredo, J.-L.; Hingtgen, S.; Shah, K. Encapsulated therapeutic stem cells implanted in the tumor resection cavity induce cell death in gliomas. *Nat. Neurosci.* 2011, 15, 197–204. [CrossRef]
- [68]. Yi, B.-R.; Hwang, K.-A.; Aboody, K.S.; Jeung, E.-B.; Kim, S.U.; Choi, K.-C. Selective antitumor effect of neural stem cells expressing cytosine deaminase and interferon-beta against ductal breast cancer cells in cellular and xenograft models. *Stem Cell Res.* 2014, 12, 36–48. [CrossRef]
- [69]. Yi, B.-R.; Kim, S.U.; Choi, K.-C. Synergistic effect of therapeutic stem cells expressing cytosine deaminase and interferon-beta via apoptotic pathway in the metastatic mouse model of breast cancer. *Oncotarget* 2015, 7, 5985–5999. [CrossRef]
- [70]. Rosenblum, D.; Joshi, N.; Tao, W.; Karp, J.; Peer, D. Progress and challenges towards targeted delivery