

**mgr Justyna Magdalena Gargaś**

**Rola oddziaływań między komórkami glejowymi  
w patogenezie następstw asfiksji neonatalnej**

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

Promotor: dr hab. Joanna Sypecka, prof. IMDiK PAN

Promotor pomocniczy: dr hab. Małgorzata Ziemka-Nałęcz



Postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora  
w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej

im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa 2023



*Składam serdeczne podziękowania następującym Osobom:*

*dr hab. Joannie Sypeckiej, prof. IMDiK PAN – za opiekę naukową, inspirację oraz cenne wskazówki, dzięki którym powstała niniejsza rozprawa doktorska;*

*dr hab. Małgorzacie Ziemce-Nałęcz – za wartościowe rady i czas spędzony przy mikroskopie;*

*dr Justynie Janowskiej – za wprowadzenie w tajniki hodowli komórkowej, pomoc w pracy laboratoryjnej i nieocenione rady;*

*mgr inż. Karolinie Ziąbskiej – za pomoc w prowadzeniu hodowli komórkowych i za naukowe rozmowy;*

*p. Helenie Świerżyńskiej – za bezcenną pomoc w pracy laboratoryjnej;*

*oraz Rodzicom, Siostrze i Szwagrowi – za możliwość rozwijania pasji oraz nieustanne wsparcie na każdym etapie pracy naukowej.*



## Finansowanie badań

Przeprowadzone badania były finansowane z następujących grantów:

- 1) 2014/15/B/NZ4/01875 (OPUS, NCN);
- 2) 2021/03/Y/NZ4/00214 (WEAVE-UNISONO, NCN);
- 3) grantu statutowego nr 6 (IMDiK PAN);
- 4) projektu nr POWR.03.02.00-00-I028/17-00 realizowanego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków ESF.

## Publikacje

Część wyników niniejszej rozprawy doktorskiej została opublikowana:

- 1) **Gargas, J.**; Janowska, J.; Ziabska, K.; Ziemka-Nalecz, M.; Sypecka, J. Neonatal Rat Glia Cultured in Physiological Normoxia for Modeling Neuropathological Conditions In Vitro. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 6000. <https://doi.org/10.3390/ijms23116000>;
- 2) Ziabska, K.; **Gargas, J.**; Sypecka, J.; Ziemka-Nalecz, M. The Impact of the Histone Deacetylase Inhibitor Sodium Butyrate on Microglial Polarization after Oxygen and Glucose Deprivation. *Pharmacol Rep* **2022**, *74*, 909–919, doi:10.1007/s43440-022-00384-x;
- 3) Janowska, J.; **Gargas, J.**; Ziemka-Nalecz, M.; Zalewska, T.; Sypecka, J. Oligodendrocyte Response to Pathophysiological Conditions Triggered by Episode of Perinatal Hypoxia-Ischemia: Role of IGF-1 Secretion by Glial Cells. *Mol. Neurobiol.* **2020**, *57*:4250–4268. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02015-z>.



## Spis treści

Wykaz skrótów .....	9
Streszczenie .....	13
Summary .....	17
Innowacyjność rozprawy .....	21
Wstęp .....	23
Komórki glejowe .....	23
Oligodendrocyty .....	24
Astrocyty .....	26
Mikroglej .....	28
Cytokiny .....	31
Chemokiny .....	32
Interleukiny .....	32
Asfiksja okołoporodowa .....	33
Przyczyny, kryteria diagnostyczne i klasyfikacja asfiksji okołoporodowej .....	34
Zmiany zachodzące w wyniku asfiksji okołoporodowej .....	35
Terapie stosowane w asfiksji okołoporodowej .....	36
Cele pracy .....	39
Materiały i metody .....	41
Pierwotna hodowla glejowa mieszana .....	41
Izolacja mikrogleju .....	42
Separacja progenitorów oligodendrocytów .....	42
Izolacja astrocytów .....	43
Współhodowle komórek glejowych .....	43
Szczurzy model neonatalnej hipoksji-ischemii in vitro .....	44
Liczenie komórek .....	45
Polilizynowanie płytek 24-dołkowych ze szkiełkami .....	45
Przygotowanie i zastosowanie wybranych biomateriałów do hodowli komórkowej .....	46
Identyfikacja fenotypu komórek glejowych metodą immunocytochemii .....	46
Zbieranie komórek .....	48
Testy immunoenzymatyczne ELISA Kits .....	48
Wieloczynnikowy test immunologiczny typu ProcartaPlex Multiplex Immunoassay .....	49
Analiza statystyczna .....	49
Wyniki .....	51

Opracowanie metody prowadzenia pierwotnej hodowli glejowej mieszanej pochodzącej z mózgow szczurów neonatalnych .....	51
Pierwotna hodowla glejowa mieszana.....	51
Komórki glejowe pochodzące z mózgow neonatalnych szczurów .....	54
Mikroglej.....	54
Progenitory oligodendrocytów.....	55
Astrocyty.....	56
Wpływ OGD na przeżywalność, proliferację, fenotyp i morfologię komórek glejowych .....	59
Charakterystyka mikrogleju.....	59
Charakterystyka progenitorów oligodendrocytów .....	61
Wpływ wybranych biomateriałów na hodowlę pierwotnych komórek glejowych in vitro .....	63
Astrocyty.....	63
Progenitory oligodendrocytów.....	67
Współhodowle komórek glejowych .....	69
Analiza sekretomu oraz ekspresji wybranych czynników w komórkach glejowych.....	72
Czynniki troficzne .....	72
Ekspresja receptorów chemokin: CXCR2 oraz CXCR4 .....	75
Ocena ekspresji wybranych cytokin .....	77
Dyskusja.....	83
Wpływ hipoksji-ischemii in vitro na komórki glejowe.....	83
Wpływ wybranych związków biomimetycznych na komórki glejowe .....	85
Hodowla neonatalnego mikrogleju i astrocytów .....	88
Analiza sekretomu oraz ekspresji czynników w komórkach glejowych .....	90
Podsumowanie i wnioski.....	99
Bibliografia.....	101



## **Wykaz skrótów**

**ATP** adenozylo-5'-trifosforan

**AAS** roztwór antybiotyk-antymikotyki

**BBB** bariera krew-mózg

**BDNF** neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego

**CCL2** ligand chemokinowy 2 z motywem C-C

**CCL3** ligand chemokinowy 3 z motywem C-C

**CD45** antygen różnicowania komórkowego 45

**CD86** antygen różnicowania komórkowego 86

**CX3CR1** receptor chemokinowy 1 z motywem C-X3-C

**CXCL1** ligand chemokinowy 1 z motywem C-X-C

**CXCL10** ligand chemokinowy 10 z motywem C-X-C

**CXCL12** ligand chemokinowy 12 z motywem C-X-C

**CXCL8** ligand chemokinowy 8 z motywem C-X-C

**CXCR2** receptor chemokinowy 2 z motywem C-X-C

**CXCR4** receptor chemokinowy 4 z motywem C-X-C

**DIV** dzień *in vitro*

**DMEM** Dulbecco's Modified Eagle's Medium

**EAAT1** transporter aminokwasów 1

**ECM Gel** żel macierzy zewnątrzkomórkowej

**ELISA Kit** test immunoenzymatyczny Enzyme-linked Immunosorbent Assay

**FBR** fibronektyna

**FBS** płodowa surowica bydlęca

**FGF** czynnik wzrostu fibroblastów

**GFAP** kwaśne białko włókienkowe

**GM-CSF** czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów

**GS** syntetaza glutaminy

**HI** hipoksja-ischemia

**HIE** encefalopatia hipoksyjno-ischemiczna

**Iba1** cząsteczka adaptera wiążąca zjonizowany wapń 1

**IGF-1** insulinopodobny czynnik wzrostu 1

**IL** interleukina

**IL10** interleukina 10

**IL1 $\beta$**  interleukina 1 $\beta$

**IL6** interleukina 6

**ITS** roztwór insuliny-transferyny-selenu

**K** wariant kontrolny

**K/OGD** wariant, w którym jedna z frakcji glejowych stanowiła kontrolę, zaś druga poddawana była procedurze OGD

**LAM** laminina

**LPS** lipopolisacharyd

**MHC** główny układ zgodności tkankowej

**NG2** antygen neuralny/glejowy 2

**NGF** czynnik wzrostu nerwów

**NOS** syntaza tlenu azotu

**OGD** deprywacja tlenu i glukozy/ wariant po OGD

**OPCs** progenitory oligodendrocytów

**OUN** ośrodkowy układ nerwowy

**PBS** sól fizjologiczna buforowana fosforanem

**PDGF** płytkopochodny czynnik wzrostu

**PLL** wodorobromek poli-L-lizyny

**RNS** reaktywne formy azotu

**ROS** reaktywne formy tlenu

**RT** temperatura pokojowa

**Sall1** czynnik transkrypcyjny Salt1-podobny

**TNF $\alpha$**  czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$



## Streszczenie

Komórki glejowe pełnią szereg podstawowych funkcji biologicznych zarówno podczas rozwoju ośrodkowego układu nerwowego (OUN), jak i w jego prawidłowym funkcjonowaniu. Proces gliogenezy, poprzedzany przez nasiloną neurogenezę i rozpoczynający się już podczas życia płodowego, jest najbardziej intensywny w okresie okołoporodowym oraz we wczesnym rozwoju postnatalnym. Właściwości powstających w tym okresie komórek zaliczanych do makrogleju, szczególnie progenitorów oligodendrocytów (OPCs), różnią się znacząco od komórek powstałych w dorosłym życiu. Jednocześnie są one wyjątkowo podatne na działanie bodźców mikrośrodowiskowych, co jest związane z ich odpowiedzią na działanie cząstek sygnałowych w procesach neurorozwojowych, ale tym samym czyni je wrażliwymi na zaburzenia homeostazy tkankowej czy też wpływ bodźców patofizjologicznych. Jest to również w dużej mierze przyczyną występowania najczęściej wysokiego stopnia uszkodzeń tkanki nerwowej pod wpływem czynników patofizjologicznych oraz urazów w okresie okołoporodowym. Zaliczamy do nich m.in. neonatalną hipoksję-ischemię (HI) zwaną także asfiksją okołoporodową.

Asfiksja okołoporodowa związana jest z nieprawidłowym przepływem krwi oraz zaburzoną wymianą gazową w okresie okołoporodowym, prowadzącą do hipoksji/anoksji i hiperkapnii. Z powodu obniżonego przepływu krwi i niedostatecznej dostępności tlenu oraz niedoboru substancji odżywczych, w tym glukozy, u noworodków dochodzi do zaburzeń ogólnoustrojowych, w tym oddechowych, do zakłóceń pracy serca i wątroby, dysfunkcji nerek, a także do zaburzeń neurologicznych. Wysoka śmiertelność lub niepełnosprawność motoryczna i poznawcza będąca skutkiem przebytego urazu sprawiają, że powikłania po HI stanowią istotny problem społeczny, znacząco wpływając na pogorszenie jakości życia pacjentów. W krajach rozwiniętych problem asfiksji okołoporodowej dotyczy 1-8 na 1000 żywych urodzeń, natomiast w krajach rozwijających się może być nawet 10-20-krotnie wyższy. Szacuje się, że obecnie około jedna piąta zgonów noworodków na całym świecie spowodowana jest przez skutki HI. Obecnie jedyną stosowaną terapią w przypadku umiarkowanej lub ostrej HI jest hipotermia terapeutyczna, polegająca na obniżeniu temperatury głowy lub ciała noworodka, w celu spowolnienia postępującego uszkodzenia komórek, ograniczenia aktywacji odpowiedzi immunologicznej i tym samym zminimalizowania stopnia uszkodzeń tkanek. Hipotermia terapeutyczna zastosowana w pierwszych sześciu godzinach od urazu znacząco zmniejsza śmiertelność i ryzyko ciężkiej niepełnosprawności, jednak w wielu przypadkach okazuje się całkowicie nieskuteczna.

Pomimo wieloletnich i wielokierunkowych badań nad mechanizmami uruchamianymi w wyniku HI i poszukiwaniu potencjalnych terapii, nadal brak jest skutecznej strategii neuroprotektynowej i neuroregeneracyjnej, celującej w naprawę uszkodzonej tkanki. Istnieje zatem pilna potrzeba poszukiwania nowych punktów uchwytu do opracowywania potencjalnych strategii terapeutycznych. Jednym z nich może być modulacja wzajemnych oddziaływań między komórkami tworzącymi tkankę nerwową. Jak dotąd, wzajemne zależności między komórkami glejowymi w rozwijającym się mózgu po wystąpieniu okresowego niedoboru glukozy i tlenu charakterystycznego dla asfiksji okołoporodowej są słabo poznane. Wśród komórek glejowych wyróżnia się makroglej, w tym astrocyty i oligodendrocyty pochodzenia ektodermalnego oraz mikroglej, wywodzący się z mezodermy. Komórki glejowe zaangażowane są w prawidłowy rozwój i funkcjonowanie układu nerwowego, jak również mają swój udział w utrzymaniu homeostazy w mikrośrodowisku tkankowym oraz w odpowiedzi immunologicznej. Aktywowane komórki glejowe produkują wachlarz czynników immunomodulujących, w tym cytokin o działaniu prozapalnym lub

przeciwzapalnym, wpływając w ten sposób na odpowiedź immunologiczną. Uwzględniając, że każdy wyspecjalizowany typ komórek glejowych uczestniczy w odpowiedzi na zaburzenia homeostazy i bodźce patofizjologiczne, wzajemne oddziaływanie komórek może mieć decydujący wpływ na przewagę procesów neuronaprawczych nad zapalnymi i neurodegeneracyjnymi, prowadząc do regeneracji uszkodzonej tkanki nerwowej i przywrócenia fizjologicznego funkcjonowania tworzących ją komórek.

Celem niniejszej pracy jest analiza wpływu okresowego niedoboru tlenu i glukozy (ang. OGD, *oxygen-glucose deprivation*), stanowiącego model HI *in vitro* na przeżywalność, proliferację, fenotyp i morfologię neonatalnych szczurzych komórek glejowych oraz analiza ich profilu sekrecyjnego, komórek hodowanych jako monokultury oraz współhodowle. W celu jak najlepszego naśladowania *in vitro* warunków panujących w tkance nerwowej, zastosowano system hodowli w warunkach normoksji fizjologicznej (5 % stężenie tlenu), a także przetestowano wybrane związki biomimetyczne (takie jak laminina, fibronektyna, żel skomponowany z wybranych składników macierzy zewnątrzkomórkowej) do pokrywania powierzchni hodowlanych. Aby ocenić rolę wybranych czynników zaangażowanych w oddziaływanie między komórkami glejowymi, zastosowano pożywki hodowlane o restrykcyjnym składzie, opartym na wykluczeniu dodatku surowicy zwierzęcej, mitogenów, hormonów oraz innych czynników, mogących potencjalnie modulować badane procesy. Wszystkie zaplanowane eksperymenty przeprowadzono na niepasażowanych hodowlach pierwotnych, aby jak najlepiej zachować właściwości badanych komórek.

Tak opracowaną metodę hodowli poszczególnych typów komórek glejowych zastosowano następnie do ilościowej oceny ekspresji wybranych substancji aktywnych, zaangażowanych w oddziaływanie międzykomórkowe, w tym czynników troficznych, takich jak insulinopodobny czynnik wzrostu typu 1 (IGF-1) oraz czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF). W celu zbadania procesów uruchamianych w następstwie OGD, zmierzono także poziom ekspresji wybranych cytokin i ich receptorów. Cytokiny stanowią grupę glikoprotein wytwarzanych przez komórki w odpowiedzi m.in. na bodźce immunologiczne i regulują szereg podstawowych funkcji komórek takich jak przeżycie, proliferacja czy dojrzewanie. Do rodziny cytokin zaliczamy m.in. interleukiny, chemokiny, czynnik martwicy nowotworów, czynniki stymulujące tworzenie kolonii, interferony oraz czynniki wzrostu. W warunkach fizjologicznych cytokiny wydzielane są przez komórki glejowe najczęściej na niskim poziomie, a ich sekrecja ulega znaczącej zmianie po wystąpieniu bodźców patofizjologicznych. Mogą one oddziaływać przeciwzapalnie, sprzyjając uruchomieniu w uszkodzonej tkance procesów o charakterze neuronaprawczym, lub pro-zapalnie, nasilając zmiany zachodzące w wyniku uszkodzenia. Ze względu na ich udział w odpowiedzi komórek na bodźce patofizjologiczne, cytokiny oraz wybrane czynniki troficzne mogą pełnić także kluczową rolę w modulowaniu oddziaływań międzykomórkowych po wystąpieniu okresowego niedoboru glukozy i tlenu.

Zaplanowane badania przeprowadzono na komórkach glejowych pochodzących z mózgow osesków szczura (24-48h *postpartum*) obu płci stada Wistar. Z wyizolowanych półkul mózgu zakładano mieszaną glejową hodowlę pierwotną. Po 11-12 dniach hodowli *in vitro*, wyodrębniano poszczególne frakcje glejowe, tj. mikroglej, progenitory oligodendrocytów oraz astrocyty poprzez sekwencyjne wytrząsanie, wykorzystując zróżnicowane właściwości adhezyjne poszczególnych typów komórek. Badania prowadzono na poszczególnych populacjach komórkowych, hodowanych jako monofrakcje oraz ich współhodowlach. W przeprowadzonych eksperymentach wykorzystywano następujące warianty współhodowli progenitorów oligodendrocytów z mikroglejem lub z astrocytami: A) wariant kontrolny (K); B) wariant eksperymentalny, w którym jedna frakcja glejowa pozostawała frakcją kontrolną, zaś druga populacja glejowa we współhodowli poddawana

była 50-minutowej procedurze OGD (K/OGD); C) wariant eksperymentalny, w którym obie frakcje glejowe we współhodowli poddawano 50-minutowej procedurze OGD. W wybranych punktach czasowych zbierano pożywki hodowlane, w których następnie oceniano ilościowo stężenie wybranych czynników aktywnych przy zastosowaniu ultraczułych metod biochemicznych, takich jak zestawy ELISA oraz Luminex.

Analiza sekretomu poszczególnych typów wyspecjalizowanych komórek glejowych hodowanych jako monofrakcje wykazała, że głównym źródłem IGF-1, wydzielanego *in situ* do mikrośrodowiska tkankowego są astrocyty, oraz w dużo mniejszym stopniu mikroglej. Jest to czynnik pełniący wiodącą rolę w proliferacji oraz dojrzewaniu oligodendrocytów. Ponieważ na skutek HI różnicowanie oligodendrocytów jest zahamowane lub opóźnione, analiza wydzielania IGF-1 przez komórki glejowe współtworzące tkankę nerwową przyczynia się do poznania podłoża zmian zachodzących po wystąpieniu HI. W dalszej kolejności oceniono ilościowo sekrecję czynnika BDNF oraz wybranych cytokin i ich receptorów. Analizy przeprowadzono zarówno dla poszczególnych typów komórek glejowych hodowanych jako monofrakcje, jak i w ich współhodowlach. W przypadku kilku z badanych czynników wykazano znamienne modulujący wpływ parakrynych oddziaływań międzykomórkowych na ich wydzielanie do pożywki hodowlanej. Wspomniany wpływ zaobserwowano m.in. w przypadku czynnika BDNF, którego poziom we współhodowlach oligodendrocytów i astrocytów jest znacznie niższy niż poziom sekrecji przez wymienione frakcje komórkowe hodowane oddzielnie. Podobny modulujący wpływ współhodowli zaobserwowano w przypadku wydzielania chemokiny CXCL1 przez oligodendrocyty i mikroglej, gdzie we wszystkich wariantach doświadczalnych odnotowano znamienne wpływ mikrogleju na wydzielanie wymienionej chemokiny przez oligodendrocyty. Analiza stężeń innych czynników aktywnych (GM-CSF, CXCL10, CCL2, CCL3, IL1 $\beta$ , IL6, IL10) nie wykazała znamienych statystycznie różnic pomiędzy hodowlami oligodendrocytów i mikrogleju a ich współhodowlami. W przypadku receptorów CXCR2 i CXCR4, znamienne wpływ oddziaływań międzykomórkowych zaobserwowano natomiast we współhodowlach oligodendrocytów i astrocytów.

Podsumowując, przeprowadzone badania mają nowatorski charakter w kontekście opracowania wydajnej metody pozyskiwania i hodowli w warunkach normoksji fizjologicznej wszystkich trzech głównych typów neonatalnych sznurzych komórek glejowych. Zastosowanie pożywek o restrykcyjnym składzie, wykluczających obecność czynników mogących wpływać modulująco na badane procesy, umożliwia wykorzystanie hodowli do modelowania *in vitro* wybranych okołoporodowych stanów patofizjologicznych. Modele *in vitro* mogą służyć zarówno do poznania oddziaływań międzykomórkowych (bezpośrednich, jak i parakrynych), a także mogą znaleźć zastosowanie w badaniach przedklinicznych do testowania wpływu potencjalnych substancji terapeutycznych na komórki glejowe. W przeprowadzonych badaniach, opisany system hodowli został wykorzystany do modelowania *in vitro* neonatalnej HI i badania oddziaływań między komórkami glejowymi na sekrecję wybranych czynników aktywnych, biorących udział w odpowiedzi komórkowej na zaburzenia lokalnej homeostazy czy obecność czynników patofizjologicznych. Jak wykazano, w przypadku wybranych czynników oraz receptorów komórkowych, oddziaływania międzykomórkowe mają znamienne wpływ na ich ekspresję. Uzyskane wyniki mogą znaleźć zastosowanie w opracowywaniu przyszłych strategii terapeutycznych do zapobiegania skutkom asfiksji okołoporodowej.





## Summary

Glial cells perform a number of essential biological functions both during the development of the central nervous system (CNS) and in its normal functioning. The process of gliogenesis, preceded by enhanced neurogenesis and beginning already during fetal life, is most intense during the perinatal period and early postnatal development. The properties of the cells generated during this period, which are classified as macroglia, especially oligodendrocyte progenitors (OPCs), differ significantly from those formed in adulthood. At the same time, they are extremely susceptible to microenvironmental stimuli, which is related to their response to the action of signaling molecules in neurodevelopmental processes, but thus makes them vulnerable to disturbances in tissue homeostasis or the impact of pathophysiological stimuli. This is also largely the reason for the occurrence of mostly high levels of neural tissue damage under the influence of pathophysiological factors and trauma in the perinatal period. These include neonatal hypoxia-ischemia (HI) also known as perinatal asphyxia.

Perinatal asphyxia is associated with abnormal blood flow and impaired gas exchange, leading to hypoxia/anoxia and hypercapnia. Due to reduced blood flow and inadequate oxygen availability and nutrient deficiency, including glucose, newborns develop systemic disorders, including respiratory, cardiac and hepatic disorders, renal dysfunction, and neurological diseases. The high mortality rate or motor and cognitive disabilities resulting from the injury make complications after HI a serious social problem, significantly affecting patients' quality of life. In developed countries, the problem of perinatal asphyxia affects 1-8 per 1,000 live births, while in developing countries it can be as much as 10-20 times higher. It is estimated that currently about one-fifth of neonatal deaths worldwide are caused by the effects of HI. Currently, the only available therapy used for the treatment of moderate or acute HI is therapeutic hypothermia, which involves lowering the newborn's head or body temperature to slow down progressive cellular damage, limit activation of the immune response and thus minimize the extent of tissue damage. Therapeutic hypothermia applied in the first six hours after injury significantly reduces mortality and the risk of severe disability, but in many cases it proves completely ineffective.

Despite years of multidirectional research into the mechanisms triggered by HI and the search for potential therapies, there is still no effective neuroprotective and neuroregenerative strategy targeting the repair of damaged tissue. Thus, there is an urgent need to search for new points of resolution to develop potential therapeutic strategies. One of them may be the modulation of the interactions between the cells that form neural tissue. So far, the interrelationships between glial cells in the developing brain following the temporary glucose and oxygen deficiency characteristic of perinatal asphyxia are poorly understood. Among glial cells, there are macroglia, including astrocytes and oligodendrocytes of ectodermal origin, and microglia, originating from the mesoderm. Glial cells are involved in the normal development and functioning of the nervous system, as well as having a role in maintaining homeostasis in the tissue microenvironment and in the immune response. Activated glial cells produce an array of immunomodulatory factors, including pro-inflammatory or anti-inflammatory cytokines, thereby influencing the *in situ* occurring intercellular processes. Considering that each specialized type of glial cell participates in the response to imbalanced homeostasis and pathophysiological stimuli, cellular interactions can have a decisive impact

on the predominance of neuroreparative processes over inflammatory and neurodegenerative mechanism, leading to the regeneration of damaged neural tissue and the restoration of its the physiological functioning.

The purpose of this study is to analyse the effects of transient oxygen-glucose deprivation (OGD), used as *in vitro* HI model, on the survival, proliferation, phenotype and morphology of neonatal rat glial cells, and to analyse their secretory profile by individual glial cell types and in their co-cultures. In order to mimic *in vitro* conditions in neural tissue, a culture system under physiological normoxia (5% oxygen concentration) was used, and selected biomimetic compounds (such as laminin, fibronectin, and a gel composed of selected extracellular matrix components) were tested to coat the surfaces of culture dishes. To assess the role of selected factors involved in interactions between glial cells, culture media of a restrictive composition based on the exclusion of the addition of animal serum, mitogens and hormones that could potentially modulate the processes studied were used. All the planned experiments were carried out on unpassaged primary cultures with the aim to preserve the properties of the cells under study.

The method thus developed for culturing individual glial cell types was then used to quantify the expression of selected active substances involved in intercellular interactions, including trophic factors such as insulin-like growth factor type 1 (IGF-1) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). In order to investigate the processes triggered by OGD, the expression levels of the selected cytokines and their receptors were also measured. Cytokines are a group of glycoproteins produced by cells in response to immune stimuli, among other things, and regulate a number of basic cellular functions such as survival, proliferation and maturation. The cytokine family includes interleukins, chemokines, tumor necrosis factor, colony-stimulating factors, interferons and growth factors, among others. Under physiological conditions, cytokines are secreted by glial cells usually at low levels, and their secretion changes significantly after pathophysiological stimuli. They can exert an anti-inflammatory effect, promoting the activation of neuron-repair processes in damaged tissue, or a pro-inflammatory effect, exacerbating the changes that occur as a result of tissue damage. Because of their involvement in the cellular response to pathophysiological stimuli, cytokines and selected trophic factors may also play a key role in modulating intercellular interactions following temporary glucose and oxygen deprivation.

The planned studies were carried out on glial cells derived from the brains of Wistar rat pups (24-48h *postpartum*). A primary mixed glial culture was established from the isolated brain hemispheres. After 11-12 days of *in vitro* culture, individual glial fractions, i.e. microglia, oligodendrocyte progenitors and astrocytes, were isolated by sequential shaking, taking advantage of the differential adhesive properties of each cell type. Studies were conducted on individual cell populations, cultured either as monofractions or co-cultures. The experiments used the following co-culture variants of oligodendrocyte progenitors with microglia or astrocytes: (A) a control variant (K); (B) an experimental variant in which one glial fraction remained the control fraction, while the other glial population in the co-culture underwent a 50-minute OGD procedure (K/OGD); (C) an experimental variant in which both glial fractions in the co-culture underwent a 50-minute OGD procedure. At the selected time points, culture media were collected, in which the concentration of selected active factors was then quantified using ultrasensitive biochemical methods such as ELISA and Luminex kits.

Analysis of the secretome of individual types of specialized glial cells cultured as monofractions showed that the main source of IGF-1, secreted *in situ* into the tissue microenvironment, are astrocytes, and to a much lesser extent microglia. It is a factor that plays a leading role in the proliferation and maturation of oligodendrocytes. Since oligodendrocyte differentiation is inhibited or delayed as a result of HI, analysis of IGF-1 secretion by glial cells co-forming neural tissue contributes to understanding the substrate of post-HI changes. Subsequently, the secretion of BDNF factor and selected cytokines and their receptors was quantified. Analyses were performed both for individual glial cell types cultured as monofractions and in their co-cultures. For several of the factors studied, a significant modulating effect of paracrine intercellular interactions on their secretion into the culture medium was demonstrated. The aforementioned effect was observed, among others, in the case of the BDNF factor, the level of which in co-cultures of oligodendrocytes and astrocytes is significantly lower than the level of secretion by the mentioned cell fractions cultured separately. A similar modulating effect of co-cultures was observed in the case of secretion of the CXCL1 chemokine by oligodendrocytes and microglia, where in all experimental variants there was a significant effect of microglia on the secretion of this chemokine by oligodendrocytes. Analysis of the concentrations of other active factors (GM-CSF, CXCL10, CCL2, CCL3, IL1 $\beta$ , IL6, IL10) showed no statistically significant differences between oligodendrocyte and microglia cultures and their co-cultures. In the case of CXCR2 and CXCR4 receptors, however, a significant effect of intercellular interactions was observed in co-cultures of oligodendrocytes and astrocytes.

In conclusion, the conducted research is novel in the context of developing an efficient method for obtaining and culturing under physiological normoxia all three main types of neonatal rat glial cells. The use of culture media of the restricted composition, which exclude the presence of factors that can possibly modulate the processes under study, makes it possible to use the cultures for *in vitro* modeling of selected perinatal pathophysiological conditions. The *in vitro* models can be used both to study basic intercellular interactions (direct as well as paracrine), and can also be used in pre-clinical research to evaluate the effects of potential therapeutic treatments. In our study, the described culture system was used to model *in vitro* the neonatal HI and to study the influence of interactions between glial cells on the secretion of selected active factors involved in the cellular response to disbalance of local homeostasis or the presence of pathophysiological stimuli. As shown, in the case of selected factors and cell receptors, glial cellular interactions have a significant effect on their expression. The results obtained may be useful in the development of future therapeutic strategies to prevent the consequences of perinatal asphyxia.



## **Innowacyjność rozprawy**

- 1) Opracowano metodę hodowli neonatalnych szczurzych komórek zaliczanych do trzech odmiennych typów komórek glejowych: mikrogleju, progenitorów oligodendrocytów i astrocytów oraz ich współhodowli w warunkach bezsurowiczych w normoksji fizjologicznej (5% O<sub>2</sub>) *in vitro*.
- 2) Wykazano, że wybrane związki biomimetyczne stosowane do pokrywania powierzchni hodowlanych wpływają na przeżywalność, morfologię i stopień proliferacji progenitorów oligodendrocytów i astrocytów.
- 3) Zbadano, jak czasowa deprywacja tlenu i glukozy *in vitro* wpływa na ekspresję wybranych markerów astrocytarnych w zależności od związku biomimetycznego, którym pokryto płytkę hodowlaną.
- 4) Wykazano, że okresowe pozbawienie komórek glejowych dostępu do tlenu i glukozy wpływa na ich zdolności wydzielnicze *in vitro* oraz na ekspresję wybranych receptorów chemokinowych *in vitro*.
- 5) Udowodniono, że zdolności wydzielnicze komórek glejowych oraz ekspresja wybranych receptorów chemokinowych w szczurzym modelu hipoksji-ischemii *in vitro* podlegają modulacji poprzez oddziaływania między różnymi typami komórek glejowych w ich współhodowlach, co może przyczynić się do wyjaśnienia patogenezy zmian w tkance nerwowej, zachodzących na skutek neonatalnej hipoksji-ischemii.



## Wstęp

### Komórki glejowe

Już w XIX wieku Rudolf Virchow opisał neuroglej jako tkankę łączną, która otacza neurony [1,2]. Do komórek glejowych/neurogleju należą makroglej (astrocyty, oligodendrocyty, komórki ependymalne) i mikroglej [1,3–8]. Komórki glejowe zaangażowane są w prawidłowy rozwój układu nerwowego, włączając w to neurogenezę, glejogenezę oraz synaptogenezę, jak również mają swój udział w kontroli procesów metabolicznych, odpowiedzi immunologicznej i prawidłowej mielinizacji [5,9,10]. Ponadto, neuroglej odgrywa istotną rolę w modulacji neuroplastyczności i kształtowaniu procesów kognitywnych i pamięciowych, mając także udział w glejotransmisji (zjawisko polegające na wymianie informacji między glejem a neuronami, np. poprzez uwalniany przez komórki glejowe glutaminian) i regulacji przepływu krwi w mózgu [5,10,11]. Aktywowane komórki glejowe produkują wachlarz czynników immunomodulujących, wpływając w ten sposób na odpowiedź immunologiczną [12,13]. W związku z powyższym, komórki glejowe są niezbędne do utrzymania prawidłowej homeostazy w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN), zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w odpowiedzi na stany patologiczne [1,7]. Ze względu na zmiany morfologiczne, molekularne i neurochemiczne zachodzące w komórkach glejowych, które mogą wpływać korzystnie lub negatywnie na zdolności neuroprotektoryjne tych komórek, wyróżniamy glejoprotekcję lub glejotoksyczność [1].

Komórki mikrogleju pochodzą z woreczka żółtkowego (mezoderma) i zasiedlają wykształcający się ośrodkowy układ nerwowy na wczesnym etapie rozwoju/embriogenezy, przez co silnie zaangażowane są w proces neurogenezy i powstawanie sieci neuronalnych, natomiast oligodendrocyty i astrocyty, rozwijające się w okresie okołoporodowym (podczas późnej embriogenezy i poporodowym), mają pochodzenie ektodermalne (powstają z neuroepitelialnych komórek macierzystych cewy nerwowej) [3–6,8,9,14–18]. Prekursorem astrocytów i oligodendrocytów jest glej radialny (komórki prekursorowe glejowe), z którego również odmigrowują neurony w nowopowstającym układzie nerwowym [5,9,15]. Co istotne, gliogeneza trwa przez całe życie, ale swój poziom szczytowy osiąga w okresie okołoporodowym i intensywnie postępuje podczas pierwszych miesięcy życia [14,16]. Astrocyty, powstające w czasie aktywnej gliogenezy, zasiedlają rozwijający się układ nerwowy, przyjmując dwa fenotypy: włóknisty (głównie w istocie białej mózgu) lub protoplazmatyczny (zlokalizowany przede wszystkim w istocie szarej mózgu) [3,19].

Komórki te stanowią dla neuronów wsparcie zarówno strukturalne, jak i troficzne, biorą udział w regulacji powstawania synaps oraz utrzymywaniu bariery krew-mózg [3,12]. Podczas gliogenezy rozwojowej, oprócz astrocytów powstają także progenitory oligodendrocytów (OPCs), które różnią się znacząco od komórek powstałych w dorosłym życiu. Jednocześnie są one wyjątkowo podatne na działanie bodźców mikrośrodowiskowych, co jest związane z ich odpowiedzią na działanie cząstek sygnałowych w procesach neurorozwojowych, ale tym samym czyni je wrażliwymi na zaburzenia homeostazy tkankowej czy też wpływ bodźców patofizjologicznych. Jest to również w dużej mierze przyczyną występowania najczęściej wysokiego stopnia uszkodzeń tkanki nerwowej pod wpływem czynników patofizjologicznych oraz urazów w okresie okołoporodowym [3]. Co istotne, kluczowym czynnikiem dla utrzymania homeostazy w mózgu jest wielokierunkowe oddziaływanie między wszystkimi typami komórek glejowych [15,19,20].

Jednym z kluczowych substratów energetycznych w ośrodkowym układzie nerwowym jest glukoza, której niedobór lub brak znacząco wpływa na metabolizm komórek glejowych, odbijając się negatywnie na ich funkcjonowaniu [1]. Stres metaboliczny powoduje zaburzenia metabolizmu glutaminianu w astrocytach, wpływa na pracę mitochondriów, często prowadzi do zmian w poziomie uwalniania czynników troficznych, jak również do aktywacji mikrogleju, do zahamowania różnicowania oligodendrocytów i w konsekwencji nawet do uszkodzenia neuronów [1]. Komórki glejowe odgrywają istotną rolę w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej, przyczyniając się do neuroprotekcji i naprawy uszkodzonej tkanki nerwowej, a ich dysfunkcje prowadzą do szeregu chorób neurorozwojowych [9,15].

## **Oligodendrocyty**

Oligodendrocyty są komórkami odpowiedzialnymi za mielinizację i wsparcie metaboliczne aksonów, formują połączenia z neuronami i przyczyniają się do podtrzymywania integralności bariery krew-mózg [6,7,9,15,19,21]. U ludzi w dojrzałym mózgu oligodendrocyty stanowią około 45-75% wszystkich komórek glejowych, zaś progenitory oligodendrocytów około 5-8% [7,19]. OPCs zasiedlające mózg mogą pozostać w formie niezróżnicowanej lub przejść wieloetapowy proces różnicowania, aby w efekcie końcowym stać się komórkami zdolnymi do mielinizacji aksonów [1,3,5,16]. Proces dojrzewania oligodendrocytów charakteryzuje się ekspresją specyficznych markerów, typowych dla danego etapu różnicowania tych komórek (**Tabela 1**) [14]. Dzięki osłonce mielinowej zapewniony jest szybki i prawidłowy przepływ impulsów nerwowych [3,9,14].



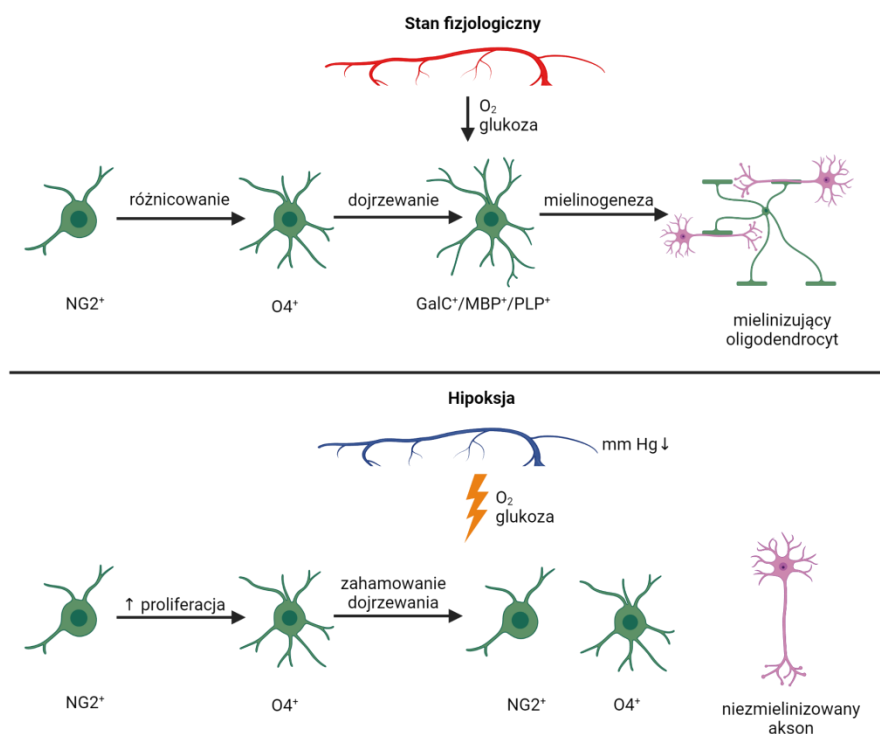
Jeden oligodendrocyt może tworzyć segmenty mielinowe nawet na 30-50 aksonach [5,22]. OPCs są źródłem czynników troficznych, takich jak neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF) czy czynnik wzrostu nerwów (NGF) i posiadają wiele cech komórek macierzystych, takich jak zdolność do migracji i proliferacji przez całe życie [23,24].

Marker oligodendrocytów	Stopień dojrzałości oligodendrocytów
NG2, Nkx2.2, Olig2, PDGFR $\alpha$	progenitory oligodendrocytów
O4, O1	komórki niedojrzałe/pre-oligodendrocyty
CNPaza, GalC	komórki różnicujące
MBP, PLP, MAG, MOG	komórki zdolne do mielinizacji

**Tabela 1** Wykaz markerów oligodendrocytów cechujących poszczególne etapy różnicowania. Skróty: NG2 – antygen neuralny/glejowy 2; Nkx2.2 – białko homeobox Nkx2.2; Olig2 – czynnik transkrypcyjny oligodendrocytów 2; PDGFR $\alpha$  – receptor  $\alpha$  dla czynnika wzrostu pochodzenia płytkowego; O4 – O-antygen; CNPaza - 2'3'-cykliczna nukleotydowa fosfodiesteraza; GalC – galaktozyloceramid; MBP – białko zasadowe mieliny; PLP – białko proteolipidowe mieliny; MAG – glikoproteina związana z mieliną; MOG – glikoproteina mieliny oligodendrocytów. Tabela sporządzona na podstawie Janowska i Sypecka 2018 [14].

Część naukowców identyfikuje również populację polidendrocytów, które charakteryzują się ekspresją antygeny neuralnego/glejowego 2 (NG2), dobrze rozwiniętymi wypustkami, ale pozostają w stanie niezróżnicowanym (nie syntetyzując komponentów mielinowych), rozsiane w parenchymie mózgu [6,14]. W wybranych warunkach patofizjologicznych najczęściej dochodzi do zaburzenia podstawowych funkcji oligodendrocytów, co prowadzi w efekcie do hipomielinizacji [5,25]. Progenitory oligodendrocytów obecne są zarówno w rozwijającym się, jak i dojrzałym ośrodkowym układzie nerwowym [23]. Wraz z wiekiem maleje liczba mielinizujących oligodendrocytów a utrata mieliny wiąże się z zaburzeniami kognitywnymi, sensorycznymi i motorycznymi [1].

OPCs są komórkami niezwykle wrażliwymi na zaburzenia homeostazy w mikrośrodowisku tkankowym, reagując na nie w dwojaki sposób: poprzez zahamowanie dojrzewania lub/i zwiększoną proliferację i migrację (**Rycina 1**) [14]. Jednym z mechanizmów odgrywających istotną rolę w przeżyciu i różnicowaniu oligodendrocytów jest stres oksydacyjny [14]. W warunkach fizjologicznych reaktywne formy tlenu (ROS) i reaktywne formy azotu (RNS) regulują przeżycie i proliferację komórek, jednakże ich nadmiar prowadzi do rozregulowania ich funkcji i zaburzenia homeostazy w mikrośrodowisku tkankowym, a w konsekwencji może prowadzić do śmierci komórek [14].



**Rycina 1** Wpływ okresowej hipoksji na biologię oligodendrocytów. Skrót: NG2 – antygen neuralny/glejowy 2; GalC – galaktozyliceramid; MBP – białko zasadowe mieliny; PLP – białko proteolipidowe mieliny; mmHg – milimetr słupa rtęci. Rycina stworzona przy użyciu programu BioRender.com. Na podstawie Janowska i Sypecka 2018 [14].

## Astrocyty

Astrocyty, komórki o gwiazdzistym kształcie, stanowią 19-40% komórek glejowych w mózgu człowieka, pełniąc szereg różnych funkcji i odgrywając szczególnie ważną rolę w chorobach neurodegeneracyjnych i odpowiedzi na urazy tkanki nerwowej [4,5,7,15,16,26]. Komórki te stanowią wsparcie strukturalne, metaboliczne i funkcjonalne neuronów, dostarczając substratów energetycznych dla mózgu, wydzielają szereg czynników aktywnych, w tym gliotransmiterów modulując w ten sposób aktywność synaptyczną, ponadto uczestniczą również w powstawaniu synaps oraz tworzeniu i utrzymaniu bariery krew-mózg (BBB) [1,7,8,12,15,27]. Do cech charakterystycznych astrocytów można zaliczyć obecność w ich cytoszkielecie filamentów pośrednich, takich jak wimentyna czy kwaśne białko włóknienkowe (GFAP) [5,28]. Zdolność astrocytów do szybkiego usuwania glutaminianu z przestrzeni synaptycznej jest możliwa za pomocą transportera aminokwasów 1 (EAAT1) i 2 (EAAT2) [1,8,19]. Kolejną ważną cechą tych komórek jest zdolność do absorpcji glukozy i rozprowadzania jej w mikrośrodowisku tkankowym [1,15]. Ponadto, komórki te wykazują zdolność do syntezy i regulacji dostępności cholesterolu, cechuje je brak aktywności elektrycznej oraz względna odporność na spadek poziomu tlenu i stężenia glukozy [5,29,30].

Pod względem morfologicznym astrocyty można podzielić na włókniste zasiedlające głównie istotę białą i protoplazmatyczne, które występują przede wszystkim w istocie szarej mózgu [15,31]. Klasycznym markerem astrocytów jest GFAP, jednakże jak pokazują badania, bardziej specyficznym markerem jest syntetaza glutaminy (GS), która konwertuje glutaminian do glutaminy [1,15].

W warunkach fizjologicznych astrocyty zaangażowane są w utrzymanie homeostazy w mikrośrodowisku tkankowym (**Tabela 2**) [5,32,33].

Procesy, w które zaangażowane są astrocyty	Funkcja astrocytów
procesy metaboliczne	regulacja: metabolizmu glukozy, stężenia jonów, zawartości wody, pH
wsparcie strukturalne	tworzenie barier, struktury syncytialne
rozwój mózgu	prolifерacja, gliogeneza, neuroplastyczność
komunikacja wewnątrzkomórkowa	glejotransmisja, regulacja transmisji synaptycznej, plastyczność
neuroprotekcja	regulacja przepływu krwi w mózgu, ochrona przeciw ekscytotoksyczności glutaminergicznej, odpowiedź immunomodulacyjna

**Tabela 2** Wykaz procesów, w które zaangażowane są astrocyty oraz pełnione przez nie funkcje. Tabela powstała za Cichorek et al., 2021 [5].

Astrocyty, wraz z mikroglejem znacząco wpływają na uwalnianie czynników zapalnych i prawidłowy wychwyty glutaminy [17,26]. Czynniki wydzielane przez astrocyty regulują także procesy biologiczne oligodendrocytów. Zaliczamy do nich płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), który promuje proliferację i migrację OPCs, jak również hamuje dojrzewanie oligodendrocytów [17]. Ponadto, astrocyty syntetyzują cholesterol, zapewniając w ten sposób wsparcie lipidowe, które jest niezbędne do prawidłowej syntezy mieliny [1,15,17,34,35].

W warunkach patologicznych astrocyty stają się reaktywne, czemu towarzyszyć może modulacja sieci molekularnej i komórkowej prowadząca do zmian ich morfologii, metabolizmu, ekspresji genów, aktywacji wybranych ścieżek sygnałowych, aktywacji procesów naprawy BBB, tworzenia blizny glejowej oraz regulacji odpowiedzi zapalnej poprzez wydzielanie cytokin pro- lub przeciwzapalnych (**Tabela 3**) [1,5,7,15,27,36]. W warunkach hipoksyjnych, astrocyty wspierają funkcje metaboliczne neuronów dostarczając substratów energetycznych powstałych na drodze glikolizy beztlenowej [5]. Ze względu na różnice w strukturze, morfologii i reaktywności można wyróżnić kilka typów astrocytów [5,37,38], a według klasycznego podziału wyodrębnia się dwa główne fenotypy reaktywnych astrocytów: A1 i A2 [17,19,39]. Astrocyty typu A1 indukowane są m.in. przez mikroglej

aktywowany lipopolisacharydem (LPS) i mają swój udział w inhibicji proliferacji i różnicowania OPCs [17]. W chorobach demielinizacyjnych, astrocyty stają się reaktywne, co przejawia się ich hipertrofią i nadregulacją filamentów pośrednich [17]. Ponadto zaobserwowano, że astrocyty w miejscach ostrego uszkodzenia mieliny mogą pełnić funkcje fagocytów [9,17]. W wyniku niedokrwienia ogniskowego dochodzi do nadmiernej aktywacji TNF $\alpha$ , co stymuluje astrocyty do wydzielania IL1 $\beta$ , IL6, interleukiny 8, czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF) czy liganda chemokinowego 2 z motywem C-C (CCL2) [40]. Natomiast astrocyty typu A2 zaangażowane są m.in. w procesy regeneracyjne w modelach ischemicznych [17].

<b>Korzystne skutki aktywacji astrocytów</b>	<b>Negatywne skutki aktywacji astrocytów</b>
wychwytywanie glutaminianu	nasilenie odpowiedzi zapalnej poprzez produkcję cytokin prozapalnych
ochrona przed ROS	uwalnianie ROS
naprawa BBB	ekscytotoksyczność (glutaminian)
redukcja obrzęku naczyniowego	zakłócenie prawidłowego funkcjonowania BBB
uwalnianie neurotrofin	-

**Tabela 3** Wykaz pozytywnych i negatywnych skutków aktywacji astrocytów. Skróty: ROS – reaktywne formy tlenu; BBB – bariera krew-mózg. Tabela powstała za Cichorek et al., 2021 [5].

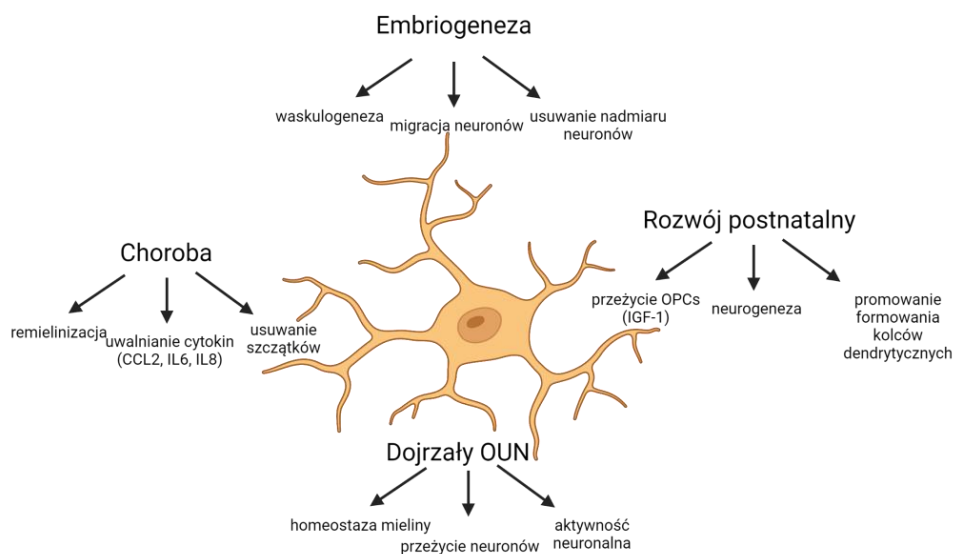
## Mikroglej

Głównym zadaniem mikrogleju jest reagowanie na zmiany w mikrośrodowisku tkankowym i utrzymywanie homeostazy [1,13,19]. W mózgu człowieka mikroglej stanowi 10-15% wszystkich komórek w ośrodkowym układzie nerwowym [5,7,15,19]. W rozwijającym się mózgu mikroglej pełni szereg ważnych funkcji, m.in. poprzez regulowanie przeżycia i fagocytozę umierających neuronów, a także poprzez zaangażowanie w procesy synaptogenezy, angiogenezy i w rozwój aksonów [5,15,17]. Ponadto w czasie rozwoju, mikroglej wydziela m.in. IL1 $\beta$  i IL6 oraz IGF-1, które w odpowiednim stężeniu promują rozwój oligodendrocytów [20,41]. Natomiast w dojrzałym mózgu komórki mikrogleju aktywnie reagują na zmiany mikrośrodowiska tkankowego, fagocytują produkty rozpadu synaps, mieliny i komórek, a także modulują neuroplastyczność poprzez regulowanie liczby progenitorów neuralnych oraz udział w procesie formowania pamięci i uczenia [1,4,7–9,15,42]. W zdrowym mózgu populacja mikrogleju odnawiana jest poprzez jego proliferację, natomiast w wyniku występujących patologii (takich jak uszkodzenie mechaniczne, stan zapalny, choroba, etc.) komórki te wspierane są przez monocyty przedostające się do tkanki z krwi [5,17]. Zdolności proliferacyjne mikrogleju maleją wraz z wiekiem [5,43].

W warunkach fizjologicznych komórki mikrogleju są silnie rozgałęzione, charakteryzującą się małym ciałem komórkowym i aktywnymi wypustkami, monitorującymi zmiany zachodzące w mikrośrodowisku tkankowym (**Rycina 2**) [1,4,15,19,44]. W rozwijającym się mózgu komórki mikrogleju są bardziej aktywne, przyjmując formę ameboidalną, przypominającą mikroglej aktywowany jaki obecny jest w stanach patologicznych układu nerwowego u dorosłych [4,26]. Ma to najprawdopodobniej związek z eliminacją nadmiaru powstających komórek oraz nieprawidłowo wykształconych synaps. Po urodzeniu dominuje subpopulacja CD11c, której komórki są głównym źródłem IGF-1 w tkance nerwowej [17,20,45]. W stanach patologicznych mikroglej aktywowany wydziela szereg czynników o charakterze prozapalnym (np. IL1 $\beta$ ) i przeciwzapalnym (np. interleukina 10/IL10), modulując w ten sposób odpowiedź immunologiczną, wpływając na pozostałe komórki glejowe i przyczyniając się do zwiększenia przepuszczalności BBB [5,20,26,27]. Ponadto mikroglej aktywowany, dzięki wzmoczeniu swoich funkcji fagocytarnych oczyszcza mikrośrodowisko tkankowe z pozostałości osłonek mielinowych i komórek, które uległy rozpadowi, a także ciałek apoptotycznych i patogenów [1,5,46]. Komórki mikrogleju obecne w istocie białej odpowiedzialne są za regulowanie liczby dojrzałych oligodendrocytów i poprzez to regulują proces mielinizacji [1,4,5,8,17,47,48]. Mikroglej jest głównym źródłem ferrytyny, niezbędnej do proliferacji i różnicowania OPCs i pełniącej ważną funkcję kofaktora dla enzymów zaangażowanych w syntezę kwasów tłuszczowych i cholesterolu niezbędnych dla biosyntezy mieliny [17].

Do najbardziej charakterystycznych markerów mikrogleju zaliczamy: cząsteczkę adaptera wiążącą zjonizowany wapń 1 (Iba1), Tmem119 (białko transmembranowe 119), P2ry12 (receptor purynergiczny P2y12), czynnik transkrypcyjny Salt1-podobny (Sall1), Olfml3 (*ang.* olfactomedin-like 3), antygen różnicowania komórkowego 45 (CD45), CD11b (antygen różnicowania komórkowego 11b) i receptor chemokinowy 1 z motywem C-X3-C (CX3CR1) [1,4,5,15]. Sall1 jest czynnikiem transkrypcyjnym odpowiedzialnym za utrzymanie mikrogleju w stanie nieaktywowanym [15,49]. W stanie spoczynkowym, komórki mikrogleju wykazują niską ekspresję następujących czynników: CD45, MHC (główny układ zgodności tkankowej) klasy II, CD80 (antygen różnicowania komórkowego 80), antygen różnicowania komórkowego 86 (CD86), CD11c (antygen różnicowania komórkowego 11c) [19]. Natomiast w wyniku aktywacji, na przykład po uszkodzeniu ischemicznym, mikroglej zmienia swój profil i charakteryzuje się wysoką ekspresją czynników takich jak: CD45, MHC

klasy II, CD86, CD8 (antygen różnicowania komórkowego 8), CD68 (antygen różnicowania komórkowego 68) czy Iba1 [19].



**Rycina 2** Funkcje fizjologiczne mikrogleju w trakcie rozwoju i w dojrzałym mózgu. Skróty: CCL2 – ligand chemokinowy 2 z motywem C-C; IL6 – interleukina 6; IL8 – interleukina 8; IGF-1 – insulinopodobny czynnik wzrostu 1; OUN – ośrodkowy układ nerwowy. Rycina stworzona przy użyciu programu BioRender.com. Na podstawie Prinz et al., 2021 [4].

Aktywacja mikrogleju jest jedną z charakterystycznych cech chorób neurologicznych, będąc pierwszą linią obrony immunologicznej i przyjmując charakterystyczne profile sekrecyjne w zależności od rodzaju patologii [1,4,5].

Klasyfikacja mikrogleju opiera się na jego morfologii i obecności markerów powierzchniowych [5,50]. Obecnie odchodzi się od klasycznego podziału mikrogleju na mikroglej aktywowany klasycznie M1 (prozapalny) oraz mikroglej aktywowany alternatywnie M2 (przeciwzapalny), na rzecz uszczegółowienia jego podtypów (klasyczny, aktywowany w przypadku uszkodzenia lub regulacyjny) [15,15,17,19,51]. Mikroglej M1 (aktywowany klasycznie) o profilu prozapalnym stymulowany jest np. przez LPS, czynnik martwicy nowotworów  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) i interferon gamma i wydziela m.in. IL1 $\beta$ , interleukinę 2, IL6, interleukinę 12, interleukinę 18, interleukinę 23, CCL2, CCL20 (ligand chemokinowy 20 z motywem C-C), CXCL9 (ligand chemokinowy 9 z motywem C-X-C), ligand chemokinowy 10 z motywem C-X-C (CXCL10), COX-2 (cyklooksygenazę indukowalną), metaloproteinazy, ROS/RNS i iNOS (indukowalną syntetazę tlenu azotu) [5,17,19,41,51,52]. Natomiast mikroglej M2a (aktywowany alternatywnie) stymulowany jest m.in. poprzez interleukinę 4 i interleukinę 13, przedstawiając fenotyp przeciwzapalny o charakterystycznych markerach takich jak: arginaza 1, CD206 (antygen różnicowania

komórkowego 206) czy IGF-1 [51,52]. Przyjmowanie przez mikroglej fenotypu M2b jest stymulowane przez tworzenie kompleksów immunologicznych i aktywację TLR (receptor toll-podobny) lub interleukinę 1, ale również LPS czy TNF $\alpha$  [52]. Dezaktywowane makrofagi (M2c) powstają zwykle pod wpływem TGF- $\beta$  (transformującego czynnika wzrostu  $\beta$ ), glikokortykoidów, IL10 lub CD200 (antygen różnicowania komórkowego 200) i wykazują stosunkowo niski poziom MHC klasy II oraz prostaglandyn, wykazując ekspresję między innymi CXCL13 (liganda chemokinowego 13 z motywem C-X-C) i przyczyniając się do tłumienia sekrecji cytokin prozapalnych [51,52]. Ponadto właściwości komórek mikrogleju różnią się w zależności od etapu ontogenezy (uwzględniając rozwój embrionalny, okres poporodowy, dorosłość, starość) [4]. W tym kontekście możemy wyróżnić: mikroglej wczesny, charakteryzujący się wysokim współczynnikiem proliferacji i zróżnicowania; premikroglej, związany z rozwojem neuronalnym (który dominuje w okresie okołoporodowym) oraz mikroglej dojrzały [5,53,54].

Gliogeneza w okresie okołoporodowym regulowana jest przez liczne czynniki obecne w mikrośrodowisku tkankowym oraz ich zmieniający się gradient, co ma wpływ na kształtowanie się architektury tkanki nerwowej. Każdy z przedstawionych typów komórek glejowych odgrywa istotną rolę zarówno w rozwoju, jak i w prawidłowym funkcjonowaniu OUN. Co ważne, omawiane komórki glejowe biorą aktywny udział w odpowiedzi immunologicznej, poprzez uwalnianie czynników immunomodulujących, m.in. cytokin [55–59]. Komunikacja między komórkami glejowymi, m.in. dzięki obecności cząsteczek sygnałowych wydzielanych na skutek ich aktywności parakrynej, zapewnia utrzymanie homeostazy tkankowej już w okresie neonatalnym.

Uwzględniając, że każdy typ komórek glejowych odgrywa kluczowe role zarówno w rozwoju OUN, jak i w odpowiedzi na bodźce patofizjologiczne, wzajemne oddziaływanie komórek może mieć decydujący wpływ na przewagę procesów neuronaprawczych nad zapalnymi i neurodegeneracyjnymi, prowadząc do regeneracji uszkodzonej tkanki i przywrócenia fizjologicznego funkcjonowania tworzących ją komórek.

## **Cytokiny**

Wśród aktywnych cząsteczek sygnałowych wyróżnić możemy cytokiny, stanowiące grupę glikoprotein regulujących szereg podstawowych funkcji komórek, takich jak przeżycie czy dojrzewanie, a także zaangażowanych w modulację odpowiedzi immunologicznej

[60,61]. Do rodziny cytokin zaliczamy interleukiny, chemokiny, nadrodzinę czynnika martwicy nowotworów, czynniki stymulujące tworzenie kolonii, interferony oraz czynniki wzrostu [60,62]. W warunkach fizjologicznych niektóre cytokiny (np. interleukina 1, TNF $\alpha$ ) wydzielane są konstytutywnie przez wszystkie typy komórek glejowych na niskim poziomie [60,63,64]. Cytokiny jako czynniki neurotroficzne promują przeżycie lub apoptozę komórek i zapewniają prawidłową komunikację między komórkami w układzie nerwowym, ponadto odgrywają krytyczną rolę w prawidłowej neurogeniezie, gliogenezie, rozwoju synaps i transmisji synaptycznej oraz odpowiedzi immunologicznej [15,60].

## **Chemokiny**

Chemokiny należą do rodziny cytokin chemotaktycznych, która obejmuje cząsteczki o masie 7-15 kDa i złożona jest z czterech podgrup charakteryzujących się motywem C, C-C, C-X-C lub C-X3-C [65–73]. Co istotne, jedna chemokina może związać się z więcej niż jednym receptorem, z wyjątkiem liganda chemokinowego 1 z motywem C-X3-C (CX3CL1), który wiąże się wyłącznie z receptorem CX3CR1 [61,67–70]. Chemokiny i ich receptory obecne są w astrocytach, oligodendrocytach, mikrogleju i neuronach [61,74].

Podstawową funkcją chemokin jest udział w migracji komórek, utrzymanie komunikacji międzykomórkowej oraz rekrutacja leukocytów w miejsce uszkodzenia [15,61,69,70,74]. Ponadto chemokiny posiadają właściwości mitogenne i mogą aktywować różne typy komórek, nasilając w ten sposób odpowiedź immunologiczną w warunkach patofizjologicznych [74–76]. Dodatkowo chemokiny regulują przepuszczalność BBB, biorą udział w transmisji synaptycznej, plastyczności i regulacji pamięci przestrzennej, zaangażowane są w modulację nasilenia procesu fagocytozy, a pośrednio także wpływają na regulację genów, adhezję i proliferację komórek, neurotransmisję i neuroprotekcję, a także są zaangażowane w rozwój neuronów, apoptozę i angiogenezę [61,68,69,74,77]. Jedną z ważniejszych cech chemokin jest kontrola aktywności mikrogleju [68]. Zmiany w mikrośrodowisku tkankowym mogą prowadzić do nadekspresji chemokin w mikrogleju, astrocytach, neuronach i komórkach endotelialnych [74].

## **Interleukiny**

Interleukiny produkowane są przez wiele typów komórek i zaangażowane są głównie w regulację procesów migracji i ich różnicowania [60]. Interleukiny (IL) należące do rodziny IL10 pełnią funkcje immunosupresyjne, dzięki czemu przyczyniają się do ograniczania



uszkodzeń powstałych w tkance [78]. Interleukiny z rodziny IL6, oprócz uczestniczenia w odpowiedzi immunologicznej, pełnią wiele funkcji już na wczesnym etapie rozwoju, np. biorąc udział w metabolizmie tkanki kostnej czy rozwoju układu nerwowego [79,80]. Natomiast interleukiny z rodziny IL1 zaangażowane są głównie w procesy związane z odpornością i w rozwój procesów zapalnych [81].

Jak przytoczono powyżej, wymienione czynniki zaliczane do różnych grup substancji czynnych w zależności od pełnionych głównych funkcji, odgrywają rolę mediatorów w oddziaływaniach międzykomórkowych. Mechanizmy zależności międzykomórkowych pozostają dotąd słabo poznane w większości stanów patofizjologicznych dotyczących procesów neurorozwojowych. Zaliczamy do nich także oddziaływania międzykomórkowe po wystąpieniu asfiksji okołoporodowej, w których aktywność cząsteczek sygnałowych jest opisana jedynie w nieznacznym stopniu. Opracowany model hodowli trzech typów komórek glejowych oraz ich współhodowli pozwala m.in. na zbadanie wpływu niedoboru glukozy i tlenu, charakterystycznego dla asfiksji okołoporodowej, na sekrecję wybranych chemokin, interleukin i czynników troficznyc.

## **Asfiksja okołoporodowa**

Asfiksja okołoporodowa zwana także hipoksją-ischemią (HI) neonatalną, spowodowana jest okresowym nieprawidłowym przepływem krwi oraz zaburzoną wymianą gazową w okresie okołoporodowym, prowadzącą do hipoksji/anoksji i hiperkapnii [14,26,82–87]. Z powodu obniżonego przepływu krwi oraz niedostatecznej dostępności tlenu, u noworodków dochodzi do rozwoju encefalopatii hipoksyjno-ischemicznej (HIE), prowadzącej do zaburzeń ogólnoustrojowych, w tym zaburzeń neurologicznych, oddechowych, do zaburzenia pracy serca, wątroby i dysfunkcji nerek [82,83]. W wyniku ischemii dochodzi również do niedoboru innych czynników, w tym glukozy [14]. Dodatkowymi czynnikami sprzyjającymi hipoksji-ischemii są przedłużający się poród czy sepsa [2]. Częściowy lub całkowity niedobór tlenu prowadzi do zaburzenia wielu procesów (m.in. glikolizy) i w efekcie może przyczyniać się do nieprawidłowego rozwoju organów, w tym mózgu [14,82]. W zależności od stopnia dojrzałości noworodka, nasilenia oraz czasu trwania niedotlenienia-niedokrwienia, uszkodzeniu mogą ulec różne obszary mózgu, w tym pień mózgu/wzgórze, zwoje podstawy, wzgórze, kora, istota szara, istota biała oraz hipokamp [86]. Duża śmiertelność i wysoki stopień niepełnosprawności u dzieci, które doświadczyły asfiksji

okołoporodowej sprawiają, że HI stanowi problem nie tylko na poziomie rodziny, ale i społeczeństwa, znacząco wpływając na pogorszenie jakości życia pacjentów [26].

### **Przyczyny, kryteria diagnostyczne i klasyfikacja asfiksji okołoporodowej**

W okresie przed porodem, uszkodzenia związane z pępowiną (np. nacisk na sznur pępowinowy), nadmierne krwawienie łożyskowe czy choroby związane z nadciśnieniem, mogą przyczynić się do hipoksji-ischemii [84,88]. Do czynników ryzyka w okresie śródporodowym zaliczamy natomiast: wcześniactwo, ograniczenie wzrostu płodu, cukrzycę ciążową, nieprawidłowe ułożenie płodu czy infekcje u matki [84]. W okresie poporodowym ryzyko uszkodzenia hipoksyjno-ischemicznego wzrasta, szczególnie na skutek urazu mózgu lub czaszki, wcześniactwa czy z powodu krytycznych wad wrodzonych serca [84].

Kryteria diagnostyczne neonatalnej encefalopatii niedotlenieniowo-niedokrwiennej obejmują następujące wskaźniki: kwasicę metaboliczną ( $\text{pH} < 7.0$ ), mniej niż 5 punktów w skali APGAR (5-10 min po urodzeniu), zaburzenia wielonarządowe, hipotonię, anormalne ruchy źrenic, brak lub słaby odruch ssania, bezdech, drgawki i zaburzenia neurologiczne nie wynikające z innych przyczyn, nieprawidłowe EEG (elektroencefalografia), konieczność reanimacji noworodka [82,86,89].

W celu ustalenia stopnia nasilenia HIE stosuje się klasyfikację Sarnata, zgodnie z którą pod uwagę brane są zaburzenia poziomu świadomości, aktywność spontaniczna, postawa, odruchy pierwotne, funkcje autonomiczne i nerwowo-mięśniowe, nieprawidłowe tętno i ciśnienie krwi [88,89]. Według klasyfikacji Sarnata wyróżnia się łagodne (nadpobudliwość), umiarkowane (letarg, hipotonia, sflumione odruchy pierwotne) i ostre (otępienie, wiotkość mięśni, brak odruchów pierwotnych) uszkodzenie mózgu [86,89]. Alternatywą dla klasyfikacji Sarnata jest klasyfikacja Thompsona, w której stosuje się podobne kryteria, z uwzględnieniem braku lub występowaniem drgawek oraz stopniem napięcia ciemniaczka [89].

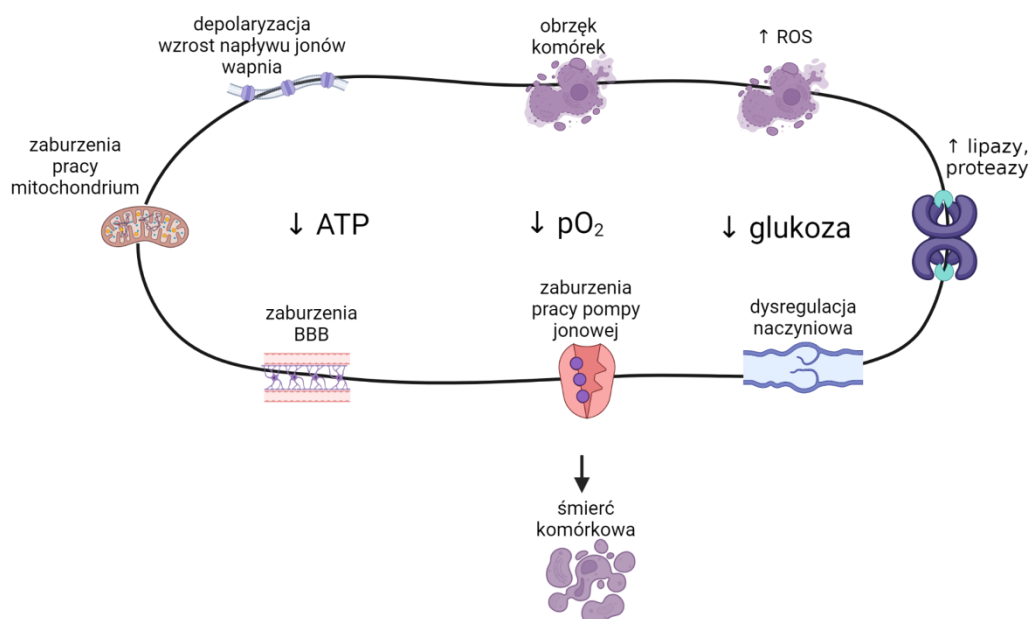
W krajach rozwiniętych problem asfiksji okołoporodowej dotyczy 1-8 na 1000 żywych urodzeń, natomiast w krajach rozwijających się może być nawet 10-20-krotnie wyższy [14,82,84–93]. Ponadto, w przypadku noworodków urodzonych przedwcześnie, z bardzo niską wagą urodzeniową, ryzyko rozwinięcia HIE wzrasta do 60% [91]. Wśród noworodków dotkniętych encefalopatią niedotlenieniowo-niedokrwinną, 24,9-30,0% dzieci cierpi z powodu permanentnych deficytów neurologicznych (takich jak zaburzony rozwój psychiczny i behawioralny, zaburzona motoryka, paraliż kończyn, drgawki, epilepsja, ślepotą czy

uszkodzenie słuchu) [26,82–86,88,89,91]. Jak pokazują badania, 25-78% dzieci z ostrym przebiegiem asfiksji neonatalnej cierpi na komplikacje kardiologiczne, z występującymi zmianami niedokrwiennymi zarówno w obrębie mózgu, jak i mięśnia sercowego [88]. Tak duży rozrzut w zaprezentowanych wynikach spowodowany jest przeprowadzaniem badań na małej grupie pacjentów [94–98]. Około 10-40% niemowląt dotkniętych HI umiera w okresie noworodkowym [26,84–86]. Jedna piąta zgonów noworodków na całym świecie spowodowana jest przez HI [84].

### **Zmiany zachodzące w wyniku asfiksji okołoporodowej**

W wyniku obniżenia ciśnienia parcjalnego tlenu i ograniczonego dostępu do glukozy dochodzi do uruchomienia niepożądanych procesów, takich jak stres oksydacyjny i ekscytotoksyczność, prowadzących do obumierania neuronów i w skrajnych przypadkach do wielopłaszczyznowego uszkodzenia mózgu [82–84,90]. Obniżenie przepływu krwi oraz postępujący spadek utleniania i fosforylacji prowadzi do wyczerpania adenozy-5'-trifosforanu (ATP) w komórkach i w efekcie do zmiany metabolizmu komórkowego z tlenowego na beztlenowy [82–84,91]. Spadek poziomu ATP powoduje uszkodzenie pompy sodowo-potasowej i destabilizację przepływu jonów przez błonę plazmatyczną, co powoduje aktywację lipaz i kaspaz, prowadząc do powstawania reaktywnych form tlenu i azotu i w efekcie do uszkodzenia mitochondriów [82–84,91]. W wyniku braku ATP dochodzi do akumulacji glutaminianu, który wiąże się z receptorem AMPA (kwasu  $\alpha$ -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowego), receptorem NMDA (N-metylo-D-asparaginowym) i receptorami kainowymi, powodując ich aktywację, w efekcie prowadząc do zwiększonego, toksycznego napływu wapnia do wnętrza komórki [83,84,90,91]. Mechanizm wychwytu zwrotnego aminokwasów ekscytotoksycznych zawodzi i dochodzi do depolaryzacji i przeładowania neuronów, a w konsekwencji do lizy komórek i ich śmierci [83]. Powyższe procesy zachodzą między 1 a 6 godziną od hipoksji-ischemii i określane są mianem fazy utajonej/pierwotnego deficytu energetycznego [84,87,90,91,93]. Częściowe przywrócenie homeostazy tlenowej prowadzi do dalszego powstawania reaktywnych form tlenu, napływu wapnia do wnętrza komórki, powodując nasiloną dysfunkcję mitochondriów [84]. Powstające wolne rodniki, ROS, syntaza tlenku azotu (NOS) i uwalniane kaspazy zwiększają nasilenie procesu apoptozy komórek [83,91]. Konsekwencją niedotlenienia mózgu jest także rozwój stanu zapalnego, w którym dochodzi do aktywacji mikrogleju oraz napływu monocytów i neutrofilów, do sekrecji cytokin i aktywacji enzymów uszkadzających barierę krew mózg, obrzęku mózgu i wzrostu ciśnienia wewnątrzczaszkowego, co określane jest mianem fazy

drugiej/reoksygenacji i występuje 6-48h od hipoksji-ischemii [26,83,84,87,90,91,93]. Faza trzeciorzędowa/faza zapalna występuje 48h do kilku tygodni/miesiący/lat od hipoksyjno-ischemicznego uszkodzenia mózgu i obejmuje postępujące procesy zapalne, zmiany epigenetyczne, ograniczone dojrzewanie oligodendrocytów, zmiany w procesie neurogenezy, zaburzenie synaptogenezy i wzrostu aksonów, astroglejozę i dalszą śmierć komórkową, w tym w wyniku wzmożonej ekspresji czynników prozapalnych [84,90,91,93]. Zmiany zachodzące w komórkach, spowodowane asfiksją neonatalną przedstawiono na **Rycinie 3**.



**Rycina 3** Zmiany na poziomie komórkowym spowodowane asfiksją neonatalną. Skróty: ATP – adenozyno-5'-trifosforan; BBB – bariera krew-mózg; pO<sub>2</sub> – ciśnienie parcjalne tlenu; ROS – reaktywne formy tlenu. Rycina stworzona przy użyciu programu BioRender.com. Na podstawie Murden et al., 2019 [83].

## Terapie stosowane w asfiksji okołoporodowej

U noworodków, które doświadczyły HI i nie mogą samodzielnie oddychać, w pierwszej kolejności stosuje się wentylację mechaniczną i stabilizuje się ciśnienie krwi [14]. Obecnie jedyną stosowaną terapią w przypadku umiarkowanej lub ostrej HI jest hipotermia terapeutyczna, polegająca na obniżeniu temperatury głowy (do  $34,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) lub ciała noworodka (do  $33-33,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) przez 48-72h, w celu ograniczenia aktywacji odpowiedzi immunologicznej, spowolnienia postępującego uszkodzenia komórek i zminimalizowania trwałych uszkodzeń [14,26,83–85,87–89,91,93,99]. Jak pokazują badania, chłodzenie całego ciała jest bardziej efektywne niż chłodzenie jedynie głowy noworodka [82]. Hipotermia terapeutyczna zastosowana w pierwszych sześciu godzinach od uszkodzenia, znacząco zmniejsza ryzyko ciężkiej niepełnosprawności (62% vs. 48% po zastosowaniu hipotermii)

oraz zwiększa przeżycie wśród noworodków (24% vs. 40%) [14,82,88]. Niestety, hipotermia terapeutyczna może być zastosowana do 6h po urodzeniu, kiedy symptomy HI są rzadko wykrywane a jej pozytywne efekty są minimalne w kontekście ochrony serca i innych organów [26,87,88]. Ponadto efekty uboczne związane z zastosowaniem terapii obejmują niedociśnienie, wazokonstrykcję naczyń obwodowych, zaburzenia diurezy, zaburzenia kardiologiczne (w tym arytmie), koagulopatię, trombocytopenię, szmer krtaniowy, dysfunkcje leukocytów, niestabilność hemodynamiczną, nadciśnienie płucne czy podskórną martwicę tłuszczową [82,88].

Obecnie proponowane są inne terapie wykorzystujące np. mannitol czy erytropoetynę, jednakże one również obarczone są skutkami ubocznymi w postaci np. dysfunkcji nerek [14,26]. Niektóre badania wskazują, że podstawowym celem terapeutycznym powinna być stabilizacja bariery krew-mózg i utrzymanie homeostazy w mikrośrodowisku tkankowym [91]. Ze względu na wiek pacjentów, i w związku z tym brak możliwości zastosowania czynników farmakologicznych przeznaczonych dla dzieci starszych lub dorosłych, do terapii poszukuje się również substancji pochodzenia roślinnego, takich jak np. ekstrakt z pestek winogron czy wanilinę, jednakże badania przeprowadzone na szczurzych/mysich/świńskich modelach często ujawniają brak neuroprotekcynnego działania badanych substancji, ale wskazują na ich właściwości przeciwzapalne [91]. Ponadto, obecnie w badaniach klinicznych oprócz wspomnianej erytropoetyny i mannitolu, testowane są: melatonina, allopurinol, gazy szlachetne, siarczan magnezu, topiramet, monosialogangliozyd czy komórki macierzyste [14,84,93]. Badania przedkliniczne obejmują natomiast przeciwutleniacze (np. resveratrol), czynniki przeciwzapalne (np. azytromycyna) i związki przeciwekscytotoksyczne (agoniści kanabinoidów) [84].

Pomimo wieloletnich i wielokierunkowych badań, nadal brak jest skutecznej terapii neuroprotekcynnej, celującej w naprawę uszkodzonej tkanki. Istnieje zatem pilna potrzeba poszukiwania nowych punktów uchwytu do opracowywania przyszłych strategii terapeutycznych. Jednym z nich jest modulacja wzajemnych oddziaływań między komórkami tworzącymi tkankę nerwową, w tym komórkami glejowymi. Jak dotąd, wzajemne oddziaływanie między komórkami glejowymi w rozwijającym się mózgu jest słabo poznane, niewiele jest także danych na temat wzajemnych zależności międzykomórkowych po wystąpieniu okresowego niedoboru glukozy i tlenu charakterystycznego dla asfiksji okołoporodowej.



## Cele pracy

Celem ogólnym niniejszej pracy jest analiza wpływu warunków hipoksyjno-ischemicznych indukowanych okresowym niedoborem tlenu i glukozy na przeżywalność, proliferację, morfologię i fenotyp oraz profil sekrecyjny komórek glejowych izolowanych z mózgow noworodków szczurzych w warunkach *in vitro*.

Cele szczegółowe:

- 1) Opracowanie modelu hodowli trzech głównych typów komórek glejowych pochodzących z mózgow szczurów neonatalnych, w warunkach normoksji fizjologicznej (5% stężenie tlenu), odwzorowującej warunki panujące w tkance nerwowej. Cel dodatkowy: zastosowanie pożywek o restrykcyjnym składzie, wykluczającym dodatek czynników mogących potencjalnie modulować badane procesy.
- 2) Zastosowanie opracowanej metody hodowli komórek glejowych do modelowania *in vitro* neonatalnej hipoksji-ischemii, polegającej na okresowym ograniczeniu dostępu komórek do tlenu i glukozy (model OGD). Zbadanie wpływu OGD na przeżywalność, proliferację i morfologię szczurzych neonatalnych komórek glejowych.
- 3) Analiza wpływu procedury OGD na ekspresję wybranych czynników troficznych, cytokin i ich receptorów w szczurzych neonatalnych komórkach glejowych.
- 4) Ocena wpływu współhodowli komórek glejowych na wydzielanie wybranych czynników aktywnych i ekspresję ich receptorów zarówno w warunkach kontrolnych, jak i po zastosowaniu procedury OGD, w celu określenia potencjalnego modulacyjnego wpływu oddziaływań międzykomórkowych na profil sekrecyjny badanych komórek.

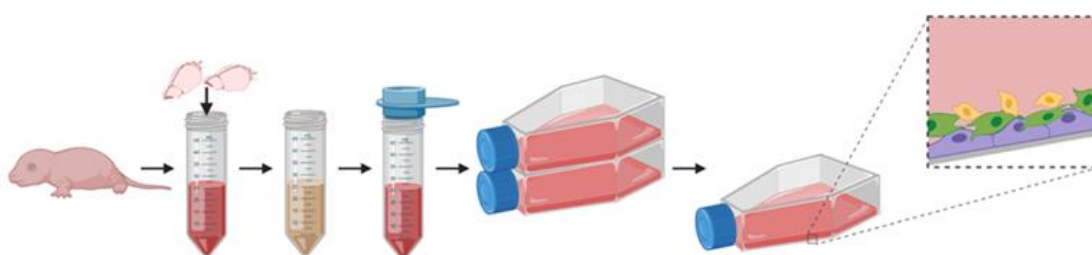




## Materialy i metody

### Pierwotna hodowla glejowa mieszana

Neonatalne szczury obu płci (24-48h *postpartum*, n =369) stada Wistar (CrI:Cmd:(WI)WU) wprowadzano w stan głębokiej hipotermii i dekapitowano, zgodnie z procedurami przyjętymi przez II Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach (decyzja nr 39/2015), według wskazań Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego. Średnia masa ciała oseska wynosiła 7g, natomiast średnia masa obu półkul mózgu 261,53 mg. Po usunięciu opon mózgowych, obie półkule mózgowie izolowano i umieszczano w pożywce składającej się z Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, wysoka glukoza, suplement GlutaMAX, Gibco), 1 % stężenia roztworu antybiotyk-antymikotyk (AAS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, USA) oraz 10% stężenia płodowej surowicy bydlęcej (FBS, inaktywowany termicznie, Gibco). Następnie zawiesinę mechanicznie homogenizowano przy użyciu pipety serologicznej o pojemności 25 ml, potem przy użyciu pipety jednokanałowej o objętości 1 ml i przy użyciu igły i strzykawki Luer-Lock o średnicy 1,2 mm. Otrzymany homogenat przepuszczano przez sitko komórkowe (pluriSelect) o średnicy porów 40µm, aby uzyskać oczyszczoną zawiesinę komórek, a następnie wysiano do butelek (Thermo Scientific Nunc, Waltham, MA, USA) o powierzchni 75 cm<sup>2</sup>, pokrytych wodorobromkiem poli-L-lizyny (PLL, Sigma-Aldrich), w gęstości  $5 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup> (**Rycina 4**).



**Rycina 4** Schemat zakładania pierwotnej hodowli glejowej mieszanej z mózgow neonatalnych szczurów, w celu uzyskania trzech głównych typów komórek glejowych. Rycina stworzona przy użyciu programu BioRender.com.

Wysiane w ten sposób komórki utrzymywano w warunkach *in vitro* przez kolejne dni jako pierwotną hodowlę glejową mieszaną, w warunkach 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 18% O<sub>2</sub>, zmieniając pożywkę hodowlaną co 2-3 dni. Po 11-12 dniach *in vitro* (DIV), gdy hodowle stały się konfluentne, wyizolowano poszczególne frakcje glejowe: mikroglej, progenitory

oligodendrocytów oraz astrocyty, wykorzystując ich zróżnicowane właściwości adherencji do podłoża (**Tabela 4**).

	<b>metody izolacji</b>	<b>gęstość [komórki/cm<sup>2</sup>]</b>
<b>mikroglej</b>	1h wytrząsania, 160 rpm	4 x 10 <sup>4</sup>
<b>OPCs</b>	15-20 h wytrząsania, 160 rpm, dwukrotnie	2 x 10 <sup>4</sup>
<b>astrocyty</b>	łagodna trypsynizacja, 5 min, 37 °C	4 x 10 <sup>4</sup>

**Tabela 4** Podsumowanie metod izolacji oraz gęstości poszczególnych frakcji komórkowych.

Wyizolowane frakcje komórkowe hodowano następnie w pożywce bezsurowiczej do 5 DIV w warunkach normoksji fizjologicznej, w inkubatorze (IncuSafe MCO-170 M Multigas Incubator, PHCBI) przeznaczonym do hodowli komórek, z regulowanym stężeniem tlenu, dzięki wyposażeniu inkubatora w czujnik Zirconia O<sub>2</sub>. Hodowle utrzymywano w stałym, 5% stężeniu tlenu do symulacji warunków *in vivo*, jego nadmiar eliminowano przy zastosowaniu azotu.

## **Izolacja mikrogleju**

Mikroglej był pierwszą izolowaną populacją komórek glejowych z pierwotnej hodowli glejowej mieszanej. Po upływie 11-12 DIV butelki umieszczano na wytrząsarce orbitalnej (Biosan) w inkubatorze o temperaturze 37°C. Komórki wytrząsano przez 1h z prędkością 160 rpm. Po tym czasie pożywkę hodowlaną zebrano i odwirowano (5 min, 2500rpm, Eppendorf) a do butelek dodano świeżą pożywkę. Odwirowane komórki mikrogleju zawieszono w pożywce bezsurowiczej, składającej się z DMEM i 1 % AAS. Komórki policzono przy użyciu Komory Bürkera i wysiano na płytki hodowlane 6- lub 24-dołkowe (Thermo Scientific Nunc), pokryte PLL, w gęstości 4 × 10<sup>4</sup>. Komórki hodowano w warunkach normoksji fizjologicznej: 5% O<sub>2</sub>, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

## **Separacja progenitorów oligodendrocytów**

Po izolacji mikrogleju, butelki ponownie umieszczano na wytrząsarce orbitalnej na czas 15-20h (160rpm, 37°C), aby uzyskać frakcję progenitorów oligodendrocytów. Po tym czasie pożywkę hodowlaną zebrano i odwirowano (5 min, 2500rpm), a do butelek dodano świeżej pożywki hodowlanej. Odwirowane komórki OPCs zawieszono natomiast w pożywce bezsurowiczej: DMEM, 1% AAS, 1 % ITS (roztwór insuliny-transferyny-selenu, *Insulin-Transferrin-Selenium-A*, Invitrogen, Waltham, MA, USA) i po policzeniu w Komorze Bürkera wysiano w gęstości 2 × 10<sup>4</sup> komórek/cm<sup>2</sup> na 6- lub 24-dołkowych płytkach

pokrytych poli-L-lizyną. W celu zwiększenia efektywności izolacji OPCs, jak również homogenności astrocytów, procedurę wytrząsania powtórzono. W przypadku konieczności zwiększenia homogenności monokultury OPCs, otrzymaną zawiesinę OPCs wysiewa się na niepowlekaną szalki Petri'ego lub butelki hodowlane, a następnie wytrząsa przez 20-30 min. Ze względu na różne właściwości adhezyjne astrocyty lub komórki mikrogleju osadzają się i przylegają do powierzchni szalki/butelki, podczas gdy OPCs pozostają w zawiesinie lub są luźno przytwierdzone do powierzchni. Delikatne postukiwanie lub przemywanie pożywką hodowlaną/PBS (sól fizjologiczna buforowana fosforanem, Gibco<sup>TM</sup>) umożliwiło odłączenie się OPCs, podczas gdy zanieczyszczające astrocyty lub mikroglej pozostały przyklejone do dna naczynia hodowlanego. Podczas kolejnych dni hodowli *in vitro* w warunkach normoksji fizjologicznej (5% O<sub>2</sub>, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>), OPCs różnicowały się w kierunku rozgałęzionych, dojrzałych oligodendrocytów, wykazujących ekspresję składników mieliny.

## **Izolacja astrocytów**

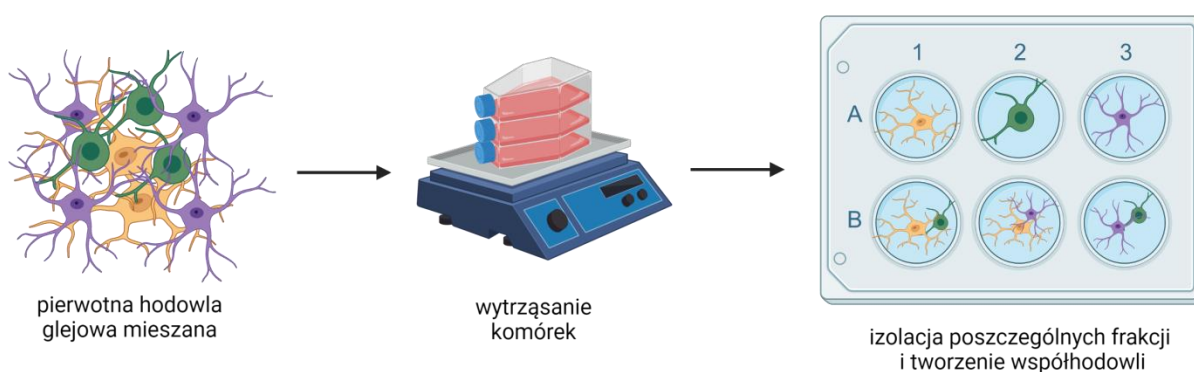
Komórki astrocytów stanowią warstwę komórek zasiedlających dno naczynia hodowlanego. Astrocyty poddawano łagodnej trypsynizacji (5 min, 37°C, Trypsin-EDTA (0,05%), phenol red, Gibco), w celu odklejenia ich od podłoża. W celu zahamowania działania trypsyny, do komórek dodawano FBS, w stosunku 2:1. Następnie komórki wirowano (5 min, 2500rpm), a otrzymany pelet przepłukiwano PBS, aby usunąć trypsynę z osadu komórek. Komórki wysiewano w gęstości  $4 \times 10^4$  komórek/cm<sup>2</sup> na płytce 6- lub 24-dółkowe, pokryte PLL i utrzymywano w warunkach normoksji fizjologicznej (5% O<sub>2</sub>, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>), w pożywce bezsurowiczej.

## **Współhodowle komórek glejowych**

Z wyizolowanych frakcji glejowych zakładane były współhodowle. Komórki hodowane były w warunkach bezsurowiczych. Tak wyizolowane komórki hodowano bezpośrednio, w układzie komórka-komórka. W przeprowadzonych eksperymentach wykorzystywano następujące warianty współhodowli progenitorów oligodendrocytów z mikroglejem lub z astrocytami (**Rycina 5**):

- 1) wariant kontrolny (K);
- 2) wariant po OGD (OGD), gdzie obie frakcje komórkowe poddawano procedurze OGD;

- 3) wariant, w którym jedna z frakcji glejowych stanowiła kontrolę, zaś druga poddawana była procedurze OGD, a następnie umieszczana we współhodowli (K/OGD).



**Rycina 5** Schemat przedstawiający wyizolowane frakcje glejowe oraz tworzenie współhodowli. A1 – mikroglej, A2 – OPCs, A3 – astrocyty, B1 - współhodowla OPCs z mikroglejem, B2 - współhodowla mikrogleju z astrocytami, B3 - współhodowla OPCs z astrocytami. Rycina stworzona przy użyciu programu BioRender.com.

## Szczurzy model neonatalnej hipoksji-ischemii *in vitro*

Pierwotne hodowle glejowe utrzymywane w warunkach normoksji fizjologicznej i w zdefiniowanych, bezsurowiczych pożywkach, mogą być wykorzystywane jako modele wybranych chorób *ex vivo*. W celu odwzorowania niedotlenienia-niedokrwienia związanego z asfiksją okołoporodową/udarem u noworodka, zastosowano deprywację tlenu i glukozy (OGD) w warunkach *in vitro*. Pożywkę hodowlaną zastąpiono pozbawionym tlenu buforem do OGD (**Tabela 5**), w którym glukoza została zastąpiona 10 mM mannitolem, aby utrzymać niezmienną ciśnienie osmotyczne. Czasowy niedobór tlenu i glukozy przeprowadzano w dedykowanej komorze inkubacyjnej Modular Incubator Chamber (Billups-Rothenberg), w której utrzymywano mieszaninę gazów o składzie 95% N<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub>. Czas trwania OGD eksperymentalnie oszacowano na 50 min. Po OGD płytki umieszczano ponownie w warunkach normoksji fizjologicznej, zastępując bufor do OGD świeżą pożywką bezsurowiczą. Wyhodowane komórki utrwalano do oznaczeń immunocytochemicznych w określonych punktach czasowych: 24h, 72h i 5 DIV lub zbierano i przechowywano (w -80°C) do późniejszych analiz biochemicznych.

<b>Bufor do OGD</b>		
<b>związek chemiczny</b>	<b>numer katalogowy, Sigma Aldrich/MERCK</b>	<b>stężenie molowe [mM]</b>
NaCl	793566-1KG	124,0
KCl	P5405-250G	4,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	P5655-100G	1,2
CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	C7902-500G	1,5 (CaCl <sub>2</sub> )
MgCl <sub>2</sub>	M1028-100ML	1,0
D-Mannitol	M4125-100G	10,0
NaHCO <sub>3</sub>	S5761-500G	25,0

**Tabela 5** Wykaz związków chemicznych wykorzystywanych w buforze do OGD.

## Liczenie komórek

Komórki poszczególnych frakcji, przed wysianiem na płytki hodowlane, zliczane były w Komorze Bürkera przy użyciu mikroskopu świetlnego Axio Vert.A1 z kamerą AxioCam 105 color lub Axiovert 25 z kamerą AxioCam MRc5 0450-354 (Carl Zeiss). Zliczano 3-5 pól w Komorze zgodnie z zasadą dwóch boków, aby uniknąć liczenia tych samych komórek, po czym uśredniano uzyskane wyniki, następnie obliczano liczbę komórek w 1 ml zawiesiny, uwzględniając objętość Komory. Po przeliczeniu gęstości komórek na cm<sup>2</sup> wysiewano je odpowiednio na płytki 6- lub 24-dółkowe. Po wysianiu komórek, sprawdzano ich homogenność znakując markerami specyficznymi dla danej frakcji. Homogenność hodowli oceniano poprzez porównanie liczby komórek wyznakowanych z całkowitą liczbą jąder komórkowych barwionych Hoechst 33342 (Sigma).

Komórki ze zdjęć przyżyciowych lub wyznakowane markerami zliczano manualnie, wybierając losowo 8-10 obszarów pola widzenia na preparacie. Do analizy statystycznej wykorzystywano pomiary z co najmniej 3 preparatów, z minimum 3 eksperymentów.

## Polilizynowanie płytek 24-dółkowych ze szkiełkami

Szkiełka nakrywkowe (bionovo) o średnicy 14 mm trzykrotnie płukano wodą destylowaną, następnie inkubowano w acetonie cz.d.a. (58,08 g/mol, CHEMPUR) przez 1-3 h. Następnie szkiełka inkubowano w 96% alkoholu etylowym cz.d.a-basic [64-17-5] (POCH BASIC) przez 1-3 h lub przez noc. Po inkubacji w alkoholu, szkiełka opalano nad palnikiem spirytusowym i układano w dołkach płytki, po czym pokrywano PLL.

## **Przygotowanie i zastosowanie wybranych biomateriałów do hodowli komórkowej**

W celu stworzenia warunków *in vitro* przypominających w wielu aspektach mikrośrodowisko fizjologiczne, badano wpływ wybranych biomateriałów na podstawowe procesy komórkowe jak przeżywalność, proliferacja i morfologia. Oprócz fizjologicznie normoksyjnych warunków dla tkanki nerwowej (5% O<sub>2</sub>) i zastosowania pożywek hodowlanych o ograniczonym składzie, powierzchnię plastikowych naczyń hodowlanych pokrywano jednym z wybranych biomateriałów: wodorobromkiem poli-L-lizyny (Sigma Aldrich), fibronektyną (FBR, Sigma Aldrich), lamininą (LAM, Sigma Aldrich), oraz żelem macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM Gel, Sigma Aldrich). PLL używano jako standardowego związku do pokrywania naczyń hodowlanych, zwiększającego adhezję komórek. FBR jest składnikiem macierzy zewnątrzkomórkowej, natomiast LAM jest składnikiem błony podstawnej. ECM Gel zawiera wybrane składniki macierzy zewnątrzkomórkowej, w szczególności różne typy kolagenu. Wszystkie płytki hodowlane zostały pokryte PLL i pozostawione do wyschnięcia na 24 godziny. Przed wysianiem komórek, dołki pokrywano następnie jednym z opisanych wyżej biomateriałów, zgodnie z zaleceniami producenta.

## **Identyfikacja fenotypu komórek glejowych metodą immunocytochemii**

W celu zidentyfikowania fenotypu hodowanych neonatalnych komórek glejowych, znakowano je przeciwciałami skierowanymi przeciwko wybranym markerom komórkowym, bazując na metodzie immunofluorescencji, używając przeciwciał specyficznych dla danego typu komórek. Monokultury lub współhodowle komórek glejowych utrwalano w wybranych punktach czasowych (24h, 72h i 5 DIV) za pomocą 4% paraformaldehydu (PFA, Sigma Aldrich/MERCK) przez 20 min w temperaturze pokojowej (RT), po czym trzykrotnie płukano je w ciepłym (RT) PBS. Następnie komórki permeabilizowano za pomocą 0,1% Triton X-100 (SERVA Serving Scientists) w PBS przez 5 min, blokowano 10% normalną surowicą kozią (Gibco) lub ośłą (Gibco) przez 1h RT i inkubowano z wybranymi przeciwciałami pierwszorzędowymi przez noc (4 °C). Stosowane markery komórkowe przedstawiono w **Tabeli 6**.

frakcja glejowa	marker	gospodarz, klonalność	rozcieńczenie	numer katalogowy	producent
mikroglej	OX42	mysie, monoklonalne	1:200	ab1211	Abcam, Cambridge, UK
	IBA1	kozie, poliklonalne	1: 400	ab107159	Abcam, Cambridge, UK
progenitory neuralne	A2B5	mysie, monoklonalne	1:200	MAB312	Millipore, Burlington, MA, USA
oligodendrocyty	CNPaza	mysie, monoklonalne	1:100	MAB326	Merck Millipore, Burlington, MA, USA
	NG2	królicze, poliklonalne	1:100	sc-20162	Chemicon, Rolling Meadows, IL, USA
	GalC	królicze, poliklonalne	1:100	MAB342	Millipore, Burlington, MA, USA
astrocyty	GS	mysie, monoklonalne	1:200	ab64613	Abcam, Cambridge, UK
	GFAP	królicze, poliklonalne	1:200	Z0334	Millipore, Burlington, MA, USA
	EAAT1	królicze, poliklonalne	1:200	ab416	Abcam, Cambridge, UK
prolifерacja komórek	Ki67	mysie, monoklonalne	1:100	NCL-L-Ki67-MM1	Leica, Wetzlar, Niemcy
-	CXCR4; fusin	mysie, monoklonalne	1:200	sc-53534	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA

**Tabela 6** Wykaz stosowanych markerów komórkowych. Skróty: OX42 – antygen różnicowania komórkowego 11b; IBA1 - cząsteczka adaptera wiążąca zjonizowany wapń 1; CNPaza – 2’3’-cykliczna nukleotydowa fosfodiesteraza; NG2 - antygen neuralny/glejowy 2; GalC – galaktozyloceramid; GS – syntetaza glutaminy; GFAP – kwaśne białko włókienkowe; EAAT1 – transporter aminokwasów 1; CXCR4 – receptor chemokinowy 4 z motywem C-X-C.

Po całkowitej inkubacji z przeciwciałami pierwszorzędowymi, komórki płukano trzykrotnie przy użyciu PBS i dodawano przeciwciała drugorzędowe sprzężone z barwnikami fluorescencyjnymi: Alexa Fluor-488 lub Alexa Fluor-546 (Thermo Fisher Scientific), w rozcieńczeniu 1:1000 przez 1h RT. Po dokładnym ponownym przepłukaniu komórek PBS, wybarwiano jądra komórkowe przy użyciu odczynnika Hoechst 33342 (15 min, RT, 1:150). Wyznakowane komórki glejowe traktowano następnie odczynnikiem Fluoromount™ (Sigma) i analizowano za pomocą superrozdzielczego systemu konfokalnego LSM 780/ ELYRA PS.1 (Carl Zeiss, Jena, Niemcy). Badania te przeprowadzono w Laboratorium Laserowych Technik

Mikroskopowych Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN.

Intensywność fluorescencji wybranych markerów była określana ilościowo przy użyciu oprogramowania ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>). Uzyskane obrazy były konwertowane do skali szarości, po czym mierzono średnią intensywność fluorescencji po odjęciu tła w określonym polu widzenia.

## Zbieranie komórek

Wszystkie komórki glejowe w hodowlach pierwotnych zbierano z wykorzystaniem łagodnej trypsynizacji. Do komórek dodawano 0,5 - 1 ml trypsyny (5 min, 37°C), a następnie pożywkę surowiczą (w stosunku 2:1) i zbierano komórki za pomocą skrobaczek (biologix). Następnie zebrane komórki (wraz z trypsyną i pożywką) wirowano (5 min, 2500rpm), płukano PBS i ponownie wirowano (5 min, 2500rpm). Komórki zamrażano (w -80°C) w 200µl PBS do oznaczeń biochemicznych.

## Testy immunoenzymatyczne ELISA Kits

Próbki wykorzystywane do oznaczeń immunoenzymatycznych rozmrażano na lodzie. Do każdej próbki dodawano 0,2µl Protease Inhibitor Cocktail (P8340, Sigma), próbki homogenizowano mechanicznie przy użyciu pipety i worteksowano (OHAUS). Następnie mierzono zawartość białka całkowitego przy użyciu odczynnika Bradforda w zakresie 0,1 - 1,4 mg/ml białka (B6916, Sigma). Po oznaczeniu zawartości białka przeprowadzano testy immunoenzymatyczne Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA Kit) w celu ilościowego oznaczania wybranych czynników. Intensywność reakcji kolorymetrycznej mierzono przy długości fali 450 nm (ELISA Kit) lub 595 nm (metoda Bradforda) za pomocą spektrofotometru Fluorostar Omega (BMG Lab Tech). Wszystkie doświadczenia z użyciem zestawów ELISA przygotowano zgodnie z protokołem producenta. Próbki zawierające nadsącz z hodowanych frakcji komórek glejowych i ich współhodowli, zawierające czynniki wydzielane przez komórki do pożywki, były dodatkowo zagęszczane przy użyciu koncentratorów Vivaspın 6 ml (10,000 MWCO PES, Z614475-100EA, Sartorius, Merck) zgodnie z instrukcją producenta. Badane czynniki przedstawiono w **Tabeli 7**.



czynnik	rodzaj badanej próbki	producent	numer katalogowy
CXCR2/IL8RB	komórki	abbexa	abx155689
CXCR4	komórki	Aviva Systems Biology	OKEH06043
CXCL12	komórki	Novus Biologicals	NBP2-75376
BDNF	pożywka hodowlana, komórki	Thermo Scientific	ERBDNF
IGF-1	pożywka hodowlana	Thermo Scientific	ERIGF1

**Tabela 7** Wykaz czynników przebadanych testami immunoenzymatycznymi ELISA Kits. Skróty: CXCR2 – receptor chemokinowy 2 z motywem C-X-C; CXCR4 – receptor chemokinowy 4 z motywem C-X-C; CXCL12 – ligand chemokinowy 12 z motywem C-X-C; BDNF – neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego; IGF-1 – insulinopodobny czynnik wzrostu.

## Wieloczynnikowy test immunologiczny typu ProcartaPlex Multiplex Immunoassay

Pożywki wykorzystywane do przeprowadzenia testu immunologicznego typu ProcartaPlex Multiplex Immunoassay (Thermo Fisher Scientific) rozmrażano na lodzie, mechanicznie rozpraszano i worteksowano. Następnie zmierzono całkowitą zawartość białka przy użyciu odczynnika Bradforda dla 0,1 - 1,4 mg/ml białka. Następnie przeprowadzono test immunologiczny ProcartaPlex Multiplex Immunoassay zgodnie z protokołem producenta. Badane cytokiny przedstawiono w **Tabeli 8**.

ProcartaPlex Multiplex Immunoassay PPX-08-MXNKTP4	
cytokina	numer kulek magnetycznych
GM-CSF	44
CXCL1	61
IL1 $\beta$	18
IL10	28
IL6	25
CXCL10	22
CCL2	51
CCL3	12

**Tabela 8** Wykaz analitów przebadanych przy użyciu ProcartaPlex Multiplex Immunoassay. Skróty: GM-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów; CXCL1 – ligand chemokinowy 1 z motywem C-X-C; IL1 $\beta$  – interleukina 1 $\beta$ ; IL10 – interleukina 10; IL6 – interleukina 6; CXCL10 – ligand chemokinowy 10 z motywem C-X-C; CCL2 – ligand chemokinowy 2 z motywem C-C; CCL3 – ligand chemokinowy 3 z motywem C-C.

## Analiza statystyczna

Uzyskane dane poddawano szczegółowej analizie statystycznej przy użyciu dedykowanego oprogramowania GraphPad PRISM 9.0. W celu porównania dwóch wariantów doświadczalnych oraz oceny istotności statystycznej różnic między analizowanymi

wariantami wykorzystano test t-studenta. W celu porównania więcej niż dwóch wariantów doświadczalnych oraz oceny istotności statystycznej różnic między analizowanymi wariantami wykorzystano jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA) z poprawką Bonfferoni'ego. W przypadku braku rozkładu normalnego stosowano test nieparametryczny Manna-Whitney'a lub Brown-Forsythe and Welch ANOVA. Dane wyrażono jako średnie odchylenie standardowe ( $\pm$ SD) lub jako jego wartość procentową, a różnice uznawano za istotne, jeśli obliczone wartości odpowiadały \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

## Wyniki

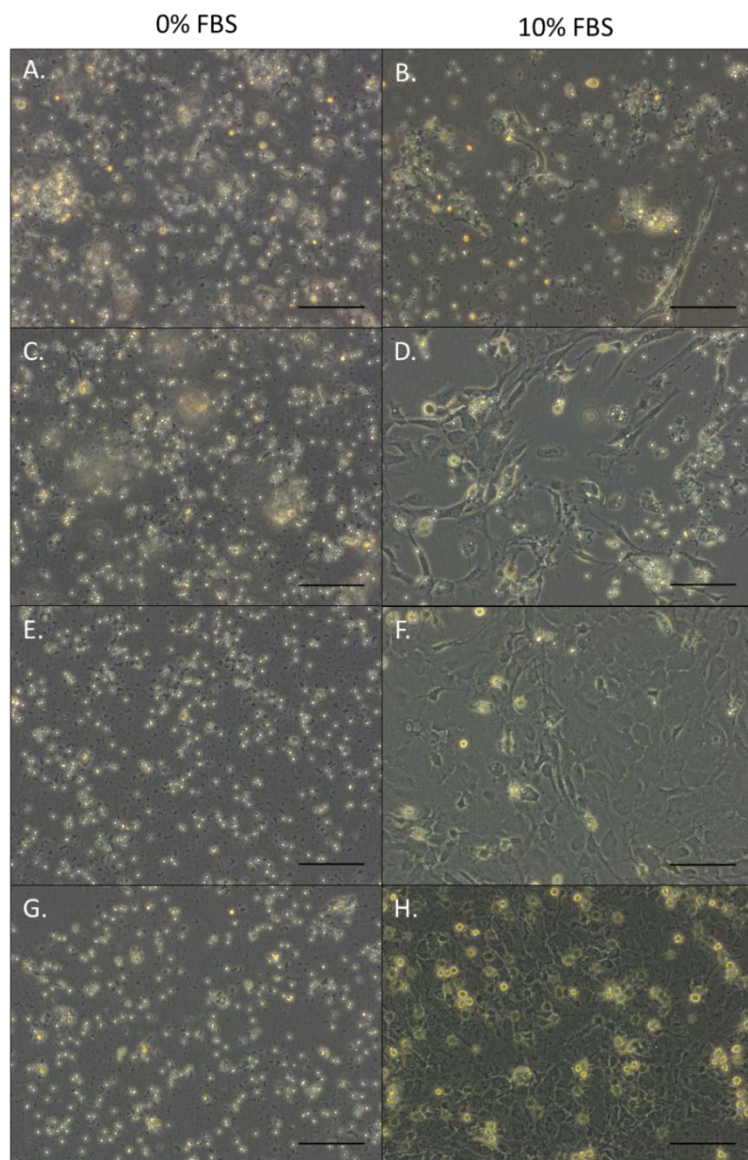
### Opracowanie metody prowadzenia pierwotnej hodowli glejowej mieszanej pochodzącej z mózgow szczurów neonatalnych

W celu optymalizacji metod prowadzenia hodowli pierwotnej komórek glejowych, przeprowadzono szereg eksperymentów, aby ustalić gęstość wysiewania poszczególnych typów komórek, jak również skład pożywki hodowlanej. Indywidualne frakcje komórkowe wysiewano w różnych gęstościach, aby sprawdzić ich przeżywalność. Po ustaleniu odpowiedniej gęstości dla każdej frakcji, komórki hodowano z dodatkiem lub bez dodatku surowicy i suplementu ITS.

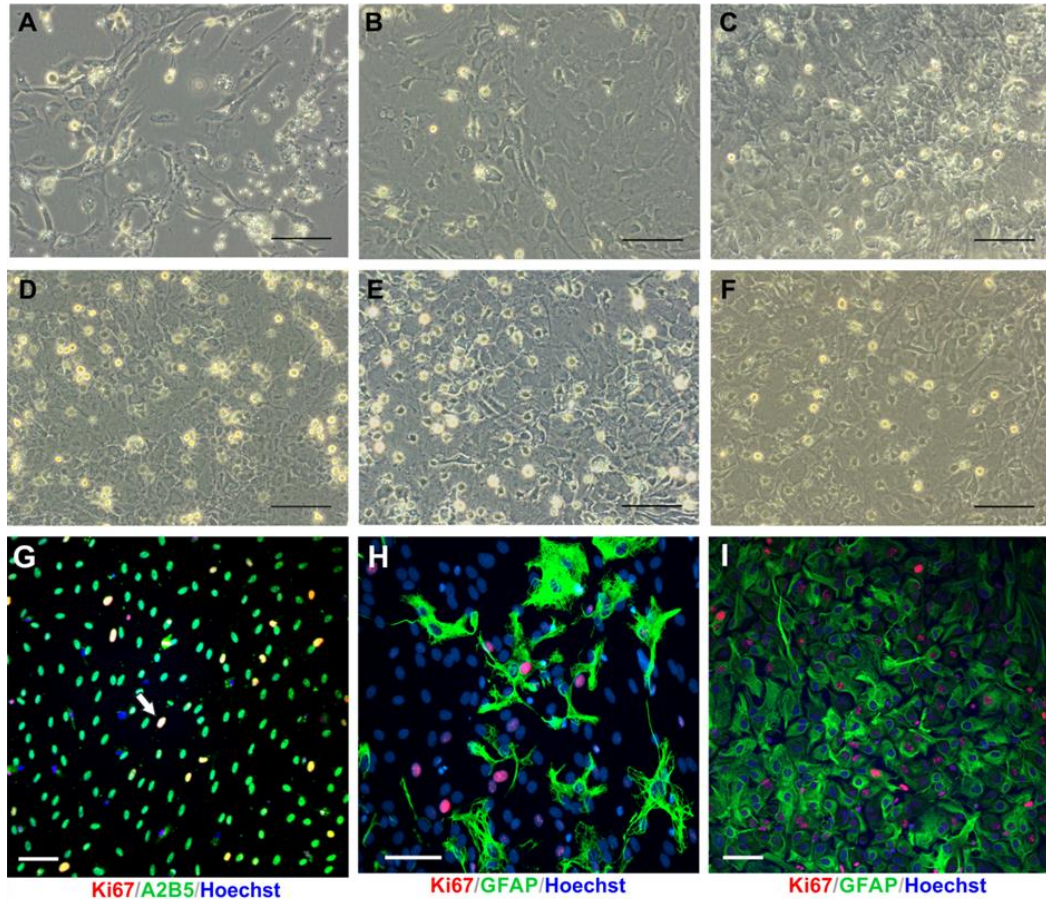
### Pierwotna hodowla glejowa mieszana

Pierwotne hodowle glejowe mieszane otrzymywano z mózgow szczurów neonatalnych, uzyskując trzy typy komórek glejowych, sklasyfikowanych jako makroglej (progenitory oligodendrocytów oraz astrocyty) o pochodzeniu ektodermalnym i mikroglej wywodzący się z mezodermy i zasiedlający kształtujące się mózgowie w czasie wczesnej embriogenezy. Aby sprawdzić czy już na etapie zakładania pierwotnej hodowli glejowej mieszanej można wyeliminować surowicę w pożywce, zawiesinę komórek pochodzącą ze zhomogenizowanych mózgow szczurzych osesków wysiano na płytki 6-dołkowe. Część komórek hodowano w warunkach bezsurowicznych, pozostałe natomiast w pożywce zawierającej 10% FBS. Przeprowadzone obserwacje przyżyciowe pokazały, że rozwój komórek w pożywce bez surowicy zostaje zahamowany już 24h po wysianiu (**Rycina 6**). Natomiast przejście z pożywki zawierającej dodatek surowicy, na bezsurowiczą w 12 DIV nie wpływa negatywnie na ich przeżywalność.

Na podstawie powyższych obserwacji, hodowlę mieszaną glejową prowadzono w pożywce zawierającej surowicę. Wysiewane komórki pierwotne były zdolne do proliferacji i różnicowania, tworząc warstwę astrocytów z OPCs i mikroglejem rozsianymi na ich powierzchni (**Rycina 7 A-F**). Komórki pierwotnej hodowli glejowej mieszanej wykazywały ekspresję markerów neuralnych takich jak A2B5 czy GFAP, jak również Ki67 – markera dzielących się komórek (**Rycina 7 G-I**). Dzięki ich zróżnicowanym właściwościom adherentnym, poszczególne typy komórek glejowych izolowano metodą wytrząsania, oryginalnie opisaną przez McCarthy'ego i de Vellis [100] w 1980 roku, jako metodę zakładania hodowli astrocytów i oligodendrocytów.



**Rycina 6** Przyżyciowe zdjęcia pierwotnej hodowli glejowej mieszanej, porównujące komórki wysiane w pożywce z dodatkiem i bez FBS w różnych punktach czasowych: 24h (**A, B**); 72h (**C, D**); 6 DIV (**E, F**); 13 DIV (**G, H**). Komórki wysiano na płytce 6-dołkowej, pokryte PLL. Skala odpowiada 100  $\mu\text{m}$ .



**Rycina 7** Pierwotna hodowla glejowa mieszana z mózgow szczerów neonatalnych. (A) Warstwa astrocytów (komórki o wydłużonym kształcie i morfologii przypominającej fibroblasty) wraz z mikroglejem i OPCs (okrągłe, opalizujące komórki), 4 DIV; (B) Semi-konfluentna pierwotna hodowla glejowa mieszana, 6 DIV; (C) Większa liczba okrągłych komórek na powierzchni warstwy astrocytów, 8 DIV; (D) Konfluentna pierwotna hodowla glejowa mieszana, z widocznym stałym wzrostem liczby komórek mikrogleju/progenitorowych, 10 DIV; (E) Pierwotna hodowla glejowa mieszana przed oddzieleniem komórek metodą wytrząsania, 11 DIV; (F) Hodowla pierwotna po odsianiu mikrogleju i OPCs; (G) Wyznakowane metodą immunocytochemiczną dzielące się komórki (Ki67<sup>+</sup>, czerwone) oraz progenitory neuralne (A2B5<sup>+</sup>, zielone) 24 h po posianiu komórek w pierwotnej hodowli glejowej mieszanej; (H) Pierwotne hodowle glejowe, barwione przeciwciałem anti-GFAP (zielone) w celu uwidocznienia astrocytów i przeciwciałem anti-Ki67 (czerwone) w celu wskazania komórek proliferujących, 4 DIV; (I) Konfluentna warstwa astrocytów (GFAP<sup>+</sup>, zielone) i dzielące się komórki glejowe (Ki67<sup>+</sup>, czerwone), 8 DIV. Jądra komórkowe barwiono odczynnikami Hoechst (niebieski). Skala odpowiada 100  $\mu$ m.

Eksperymenty przeprowadzone w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej IMDiK PAN potwierdziły słabe właściwości adhezyjne progenitorów oligodendrocytów, w porównaniu do pozostałych komórek glejowych. Dzięki tym właściwościom możliwe jest oczyszczanie odseparowanych frakcji glejowych, pozwalające uzyskać 99% jednorodność danej frakcji, ponieważ OPCs mogące kontaminować frakcję mikroglejową i astrocytarną pozostają w pożywce hodowlanej, podczas gdy pozostałe dwa typy komórek glejowych relatywnie szybko ulegają adhezji do podłoża hodowlanego. Usunięcie nadmiaru pożywki i zastąpienie jej

świeżą do 30 minut od wysiania komórek znacząco zwiększa homogenność poszczególnych populacji glejowych.

### **Komórki glejowe pochodzące z mózgów neonatalnych szczurów**

Liczebność komórek składających się na poszczególne wyizolowane frakcje glejowe oszacowano przed wysiewaniem ich do dalszych eksperymentów. W **Tabeli 9** przedstawiono uśrednioną liczbę uzyskiwanych komórek poszczególnych frakcji glejowych.

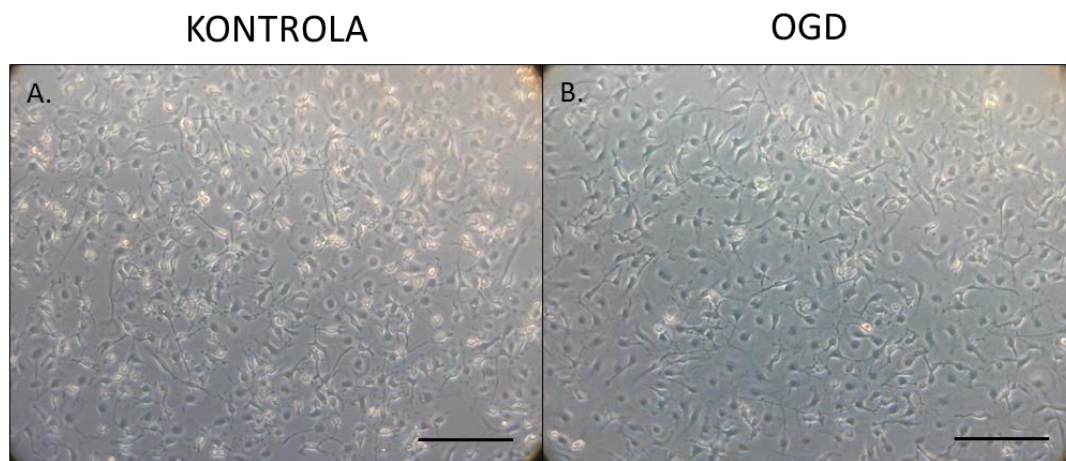
	<b>oszacowana liczba komórek/mózg</b>	<b>% populacji hodowanych komórek neonatalnych</b>
mikroglej	$5,77 \times 10^5$	$7,19 \pm 3,17$
OPCs	$26,52 \times 10^5$	$20,87 \pm 8,70$
astrocyty	$85,84 \times 10^5$	$72,00 \pm 10,00$

**Tabela 9** Podsumowanie otrzymywanej liczby komórek poszczególnych frakcji glejowych w przeliczeniu na mózg oseska szczura oraz procent, jaki stanowiły poszczególne frakcje komórkowe w populacji hodowanych komórek glejowych.

Komórki wyizolowane z mieszanej hodowli glejowej, hodowane jako monofrakcje, utrzymywano w normoksji fizjologicznej (5% stężenia tlenu), w celu odwzorowania fizjologicznych warunków panujących w ośrodkowym układzie nerwowym. Poszczególne frakcje komórkowe (mikroglej, OPCs i astrocyty) hodowano do 5 DIV w warunkach bezsurowicznych, aby móc badać wybrane procesy biologiczne oraz interakcje międzykomórkowe. Środowisko bezsurowiczne pozwala uniknąć dodatkowej stymulacji komórek poprzez aktywne czynniki, które mogłyby potencjalnie zaburzyć badane mechanizmy.

### **Mikroglej**

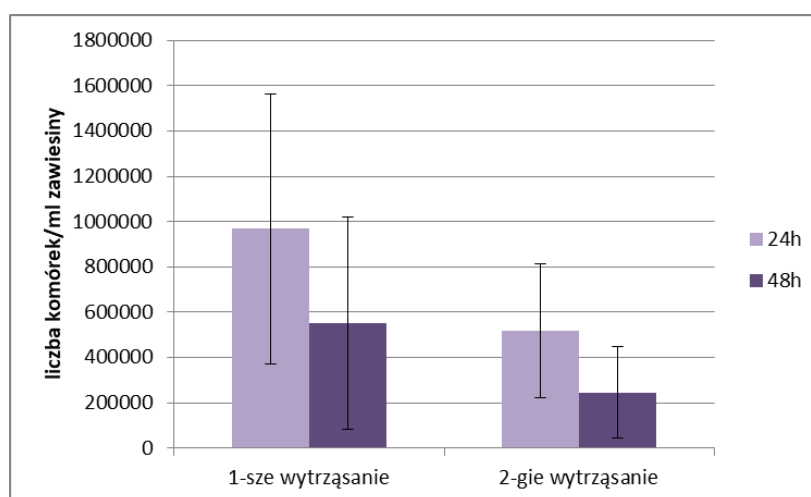
Gęstość hodowli komórek mikrogleju ustalono eksperymentalnie, wybierając spośród wariantów 15.000 komórek/cm<sup>2</sup> oraz 40.000 komórek/cm<sup>2</sup>. Komórki mikrogleju są wrażliwe na zmiany w mikrośrodkowisku komórkowym, jednak warunki bezsurowiczne są sprzyjającym środowiskiem do rozwoju mikrogleju, zarówno w warunkach kontrolnych, jak i po OGD (**Rycina 8**).



**Rycina 8** Przybliżone zdjęcia neonatalnego mikrogleju, porównujące komórki wysiane w pożywce bezsurowiczej w warunkach kontrolnych (A) i po OGD (B) w punkcie czasowym 24h. Komórki wysiano na płytki 24-dółkowe, pokryte PLL. Skala odpowiada 100  $\mu$ m.

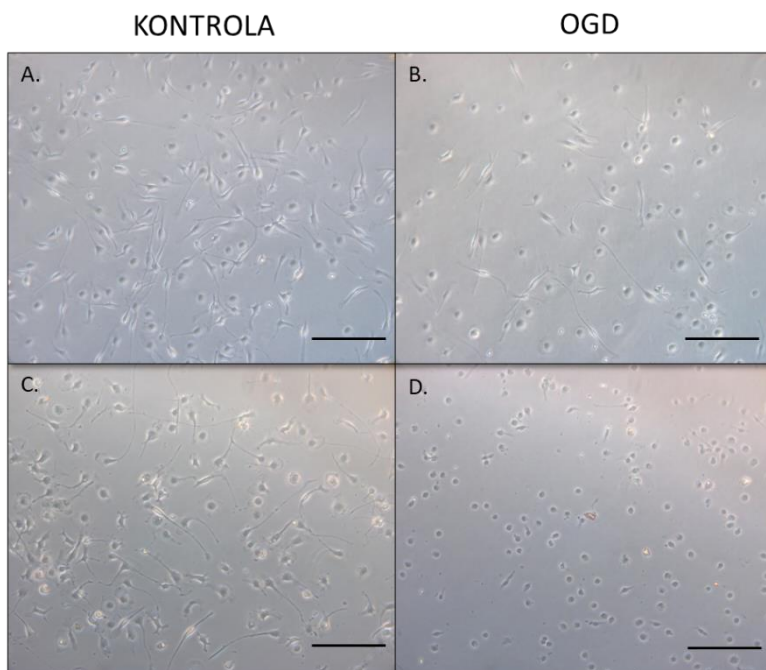
### Progenitory oligodendrocytów

Aby zwiększyć liczebność uzyskiwanej frakcji komórkowej, progenitory oligodendrocytów odsiewano dwukrotnie. Analizy przeprowadzone na komórkach pozyskanych ze 132 szczurzych osesków (uzyskanych z 13 niezależnych preparatyk) pokazały, że wiek osesków (odpowiednio 24h lub 48h) wpływa na liczbę pozyskiwanych komórek. Po pierwszej rundzie wytrząsania różnica w liczbie otrzymywanych OPCs między oseskami 24 i 48 godzin *post partum* wynosiła 11,23 %, natomiast w dodatkowej drugiej rundzie wytrząsania przeprowadzanej w celu zwiększenia wydajności pozyskiwania OPCs różnica ta sięgała 26,01% (**Rycina 9**).



**Rycina 9** Graficzne przedstawienie liczby komórek progenitorów oligodendrocytów otrzymywanych w dwóch kolejnych wytrząsaniach, zależne od wieku osesków (24h vs. 48h).

Progenitory oligodendrocytów hodowano w gęstości 20.000 komórek/cm<sup>2</sup>, w pożywce bezsurowiczej. Warunki te ustalono eksperymentalnie w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej. Dodatek ITS do pożywki hodowlanej zwiększa przeżywalność komórek, nie wpływając na ich morfologię (**Rycina 10**).

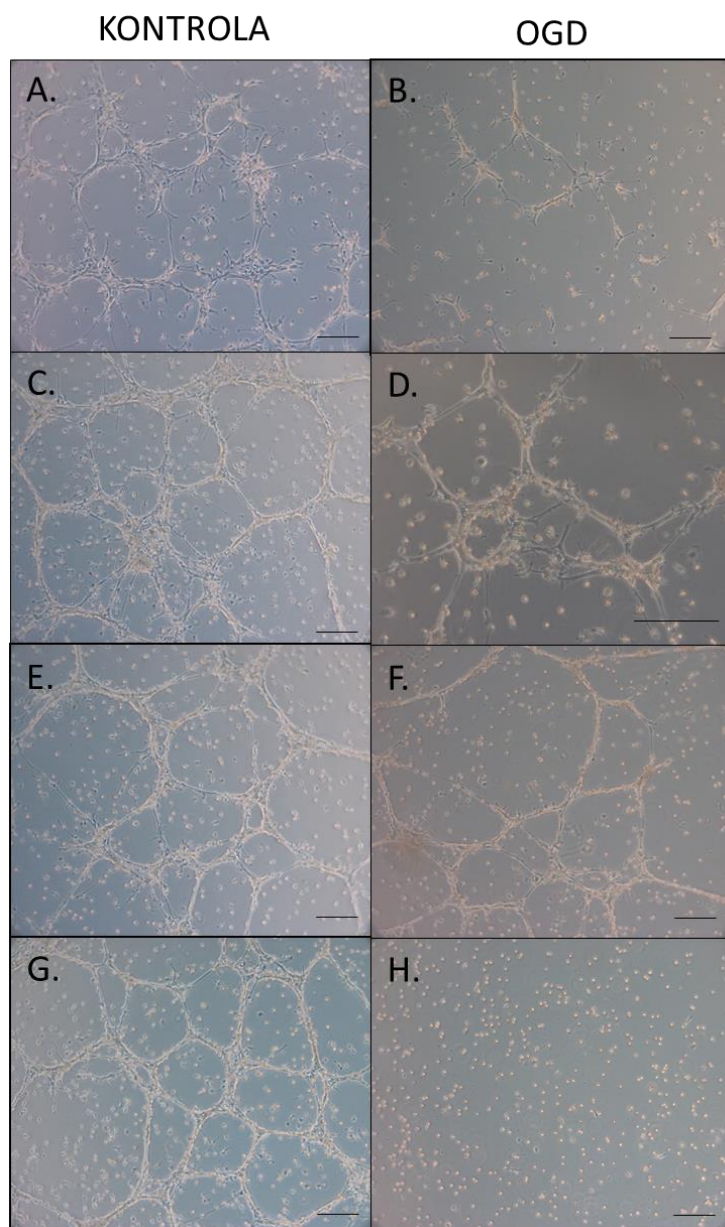


**Rycina 10** Przyżyciowe zdjęcia progenitorów oligodendrocytów, porównujące komórki wysiane w pożywce z dodatkiem i bez ITS, w punkcie czasowym 24h. (**A, B**) Progenitory oligodendrocytów hodowane w pożywce bez dodatku ITS; (**C, D**) Progenitory oligodendrocytów hodowane w pożywce z dodatkiem 1 % ITS. Komórki wysiano na płytce 24-dołkowej, pokrytej PLL. Skala odpowiada 100  $\mu$ m.

## Astrocyty

Astrocyty, jako komórki o najsilniejszych właściwościach adhezyjnych spośród frakcji glejowych, izolowane były poprzez trypsynizację jako trzecia, ostatnia frakcja glejowa. Optymalną gęstość hodowli astrocytów ustalono eksperymentalnie, wybierając spośród następujących wariantów: 15.000 komórek/cm<sup>2</sup>, 40.000 komórek/cm<sup>2</sup>, 60.000 komórek/cm<sup>2</sup> i 80.000 komórek/cm<sup>2</sup>. Komórki najlepiej rozwijały się w gęstości 40.000 komórek/cm<sup>2</sup>, tworząc widoczne połączenia międzykomórkowe (**Rycina 11**). W gęstościach wyższych niż 40.000 komórek/cm<sup>2</sup>, komórki szybko zużywały składniki odżywcze, dochodziło do zakwaszenia pożywki i w efekcie do obumarcia hodowli w kolejnych dniach hodowli.

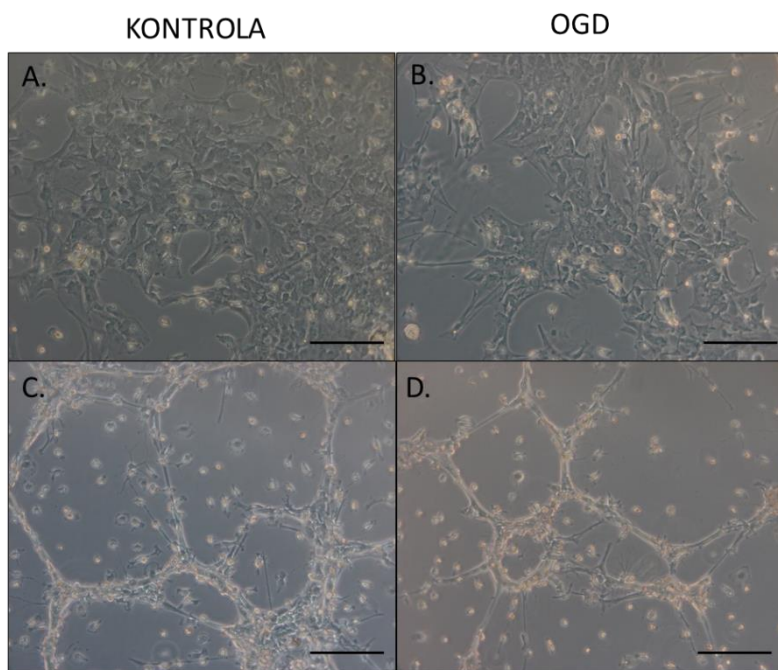




**Rycina 11** Przyżyciowe zdjęcia neonatalnych astrocytów, porównujące komórki wysiane w pożywce bez FBS, w różnych gęstościach po 24h hodowli: (A, B) 15.000 kom./cm<sup>2</sup>; (C, D) 40.000 kom./cm<sup>2</sup>; (E, F) 60.000 kom./cm<sup>2</sup>; (G, H) 80.000 kom./cm<sup>2</sup>. Komórki wysiano na płytki 24-dołkowe, pokryte PLL. Skala odpowiada 100 μm.

Astrocyty są również najbardziej odporne na zmieniające się mikrośrodowisko komórkowe w porównaniu do mikrogleju i OPCs. Właściwości te umożliwiają prowadzenie hodowli astrocytów w warunkach bezsurowiczych. W pożywce z dodatkiem 10% FBS zaobserwowano gęsto usieciowane komórki, tworzące wielowarstwę, natomiast w pożywce bezsurowiczej sieć komórkowa jest mniej gęsta, dzięki czemu możemy obserwować pojedyncze komórki (**Rycina 12**). Astrocyty hodowane bez dodatku surowicy, tworzą mniej zwarte sieci, bardziej wrażliwe na uszkodzenie. Dlatego, przy dłuższych czasach hodowli

dodatek surowicy do pożywki hodowlanej wywiera korzystny wpływ na astrocyty. Obserwacje przyżyciowe pozwoliły ustalić, że dodatek ITS do pożywki hodowlanej nie wpływa na przeżywalność czy morfologię astrocytów.



**Rycina 12** Przyżyciowe zdjęcia neonatalnych astrocytów, porównujące komórki wysiane w pożywce z dodatkiem 10% FBS (**A, B**) i bez FBS (**C, D**), w punkcie czasowym 24h. Astrocyty hodowane w pożywce z dodatkiem 10% FBS tworzą gęstą sieć komórkową; natomiast astrocyty hodowane bez dodatku surowicy, tworzą mniej zwarte sieci, bardziej wrażliwe na uszkodzenie. Komórki wysiano na płytki 24-dółkowe, pokryte PLL. Skala odpowiada 100  $\mu\text{m}$ .

Na podstawie powyższych wyników ustalono najbardziej optymalne warunki hodowli dla:

- 1) OPCs: 20 000 kom./ $\text{cm}^2$ , pożywka bez FBS i z dodatkiem 1% ITS;
- 2) mikrogleju i astrocytów: 40 000 kom./ $\text{cm}^2$ , pożywka bez FBS;

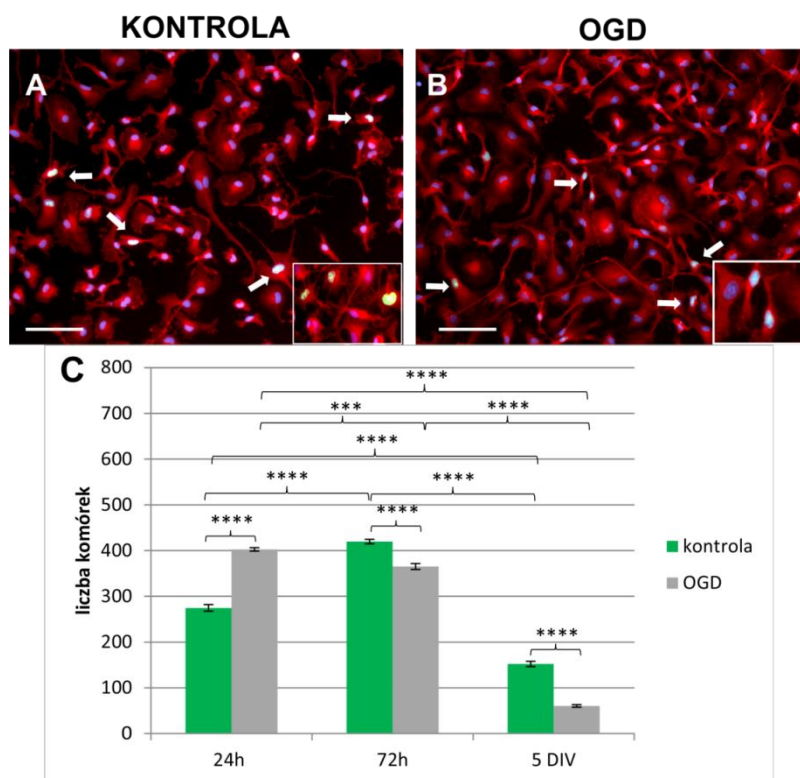
i takie warianty hodowlane zostały wybrane do dalszych badań.

## Wpływ OGD na przeżywalność, proliferację, fenotyp i morfologię komórek glejowych

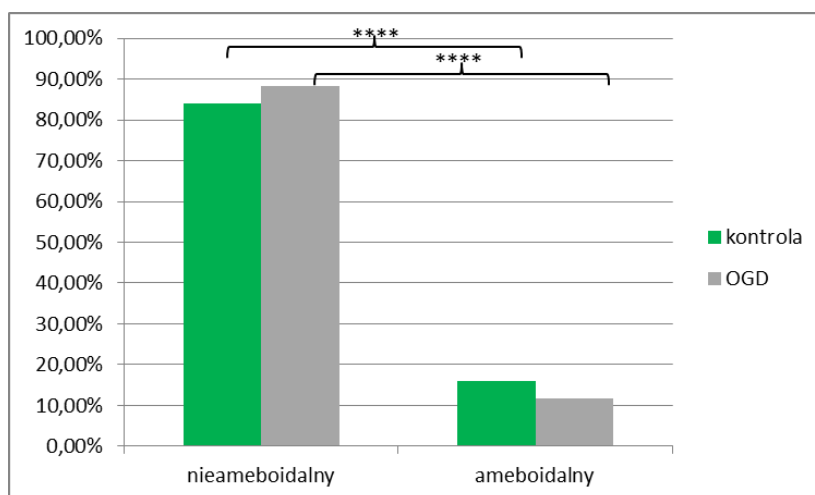
### Charakterystyka mikrogleju

Pierwszą z izolowanych frakcji komórkowych jest populacja mikrogleju. Otrzymane komórki posiadają morfologię charakterystyczną dla mikrogleju hodowanego w warunkach *in vitro*, jak również wykazują ekspresję markerów typowych dla fenotypu spoczynkowego, IBA1 (**Rycina 12 A, B**) oraz OX42. W warunkach *in vitro* komórki mikrogleju proliferują, czego potwierdzeniem jest obecność jąder komórkowych wyznakowanych przeciwciałem anty-Ki67<sup>+</sup> (**Rycina 12 A-C**). Procedura OGD znacząco wpływa na gęstość hodowli mikrogleju. Już po 24h hodowli w wariancie poddanym procedurze OGD odnotowano wzrost gęstości komórek o 146,60%, natomiast po 72h hodowli i w 5 DIV zaobserwowano spadek gęstości mikrogleju odpowiednio o 87,05% i 39,61%. Ponadto, w wariancie kontrolnym stwierdzono wzrost gęstości komórek o 65,45% po 72h, po czym następował spadek o 180,31% w 5 DIV w porównaniu do komórek hodowanych przez 24h. W tym wariancie zaobserwowano również spadek gęstości komórek o 275,49% w 5 DIV, w porównaniu do komórek hodowanych przez 72h. W wariancie poddanym procedurze OGD odnotowano natomiast spadek gęstości komórek o 110,22% po 72h hodowli oraz o 667,40% w 5 DIV w porównaniu do komórek hodowanych przez 24h. Podobny spadek gęstości zaobserwowano w 5 DIV w porównaniu do komórek hodowanych 72h (605,52%).

W wyniku działania czynników zewnątrzkomórkowych, komórki mikrogleju ulegają aktywacji i m.in. mogą zmieniać swój fenotyp na ameboidalny, związany ze zwiększeniem ich właściwości fagocytarnych [46]. Zarówno procedura izolacji (sekwencyjne wytrząsanie, płukanie, wycofanie surowicy z pożywki hodowlanej, dyspersja), jak i procedura OGD, której poddawane są komórki w modelu wykorzystywanym w niniejszych badaniach, mogła być potencjalnym sygnałem do zmiany fenotypu. Aby ocenić czy OGD przyczynia się w ciągu pierwszych 24 godzin od wykonania procedury do zmiany morfologii komórek hodowanych *in vitro* w normoksji fizjologicznej, komórki zliczono manualnie. Otrzymane wyniki wskazują, że procedura OGD nie prowadzi do zmiany morfologii komórek mikrogleju, przewagę (84,15% w warunkach kontrolnych i 88,26% po OGD) stanowią komórki rozgałęzione (**Rycina 13**).



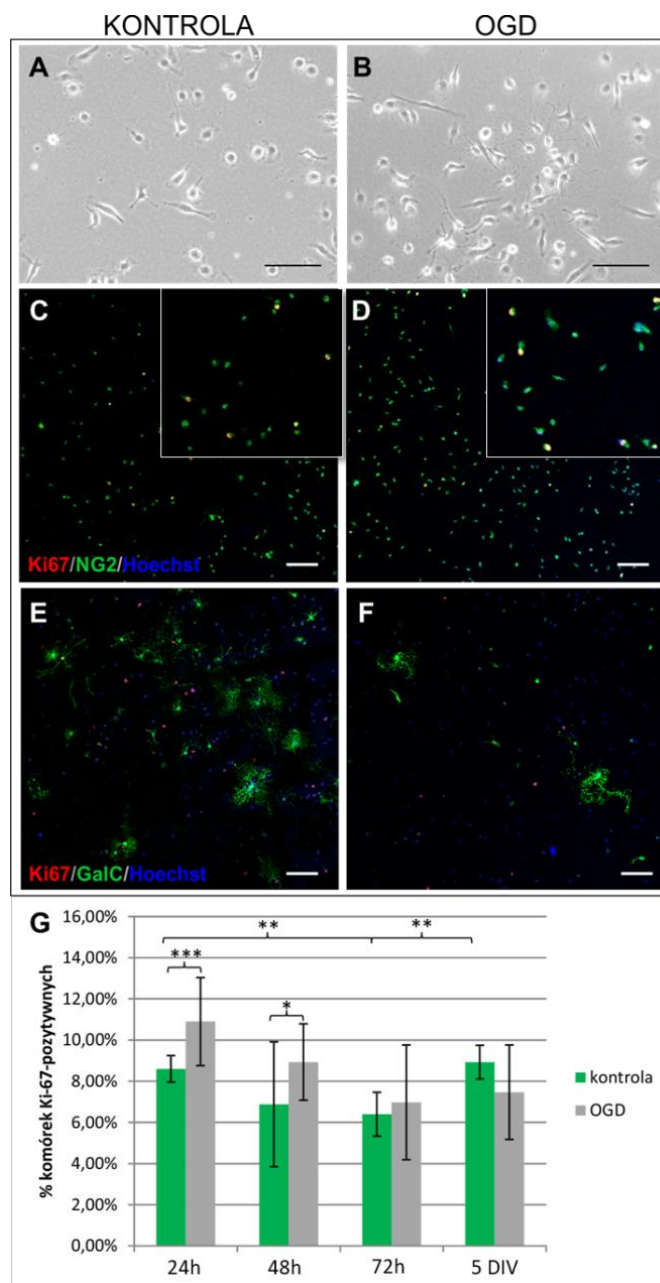
**Rycina 12** Mikroglej, pierwszy typ komórek uzyskanych z pierwotnej hodowli glejowej mieszanej. **(A)** Podczas hodowli *in vitro* zachowana jest typowa morfologia mikrogleju spoczynkowego, co potwierdza wyznakowanie markerem IBA1 (czerwony). Podczas pierwszych 2 DIV komórki aktywnie dzielą się, na co wskazuje znakowanie komórek IBA1<sup>+</sup> przeciwciałem anti-Ki67 (zielony). **(B)** Analiza 24 h po OGD nie wykazała istotnych zmian w morfologii komórek. Białe strzałki wskazują proliferujący mikroglej Ki67<sup>+</sup>. Jądra komórkowe wyznakowano za pomocą odczynnika Hoechst (niebieski). Skala odpowiada 100 μm. **(C)** Graficzna prezentacja liczby komórek mikrogleju w wariancie kontrolnym i poddanym procedurze OGD. Liczba komórek mikrogleju liczona z kilku obszarów o rozmiarze 1214,6 μm x 1214,6 μm. \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001



**Rycina 13** Porównanie procentowego udziału mikrogleju nieameboidalnego vs. ameboidalnego wprowadzonego z pierwotnej hodowli glejowej mieszanej i poddanego procedurze OGD wskazuje, że procedura OGD nie powoduje zmiany morfologii mikrogleju w punkcie czasowym 24h. \*\*\*\* p < 0.0001

## Charakterystyka progenitorów oligodendrocytów

Progenitory oligodendrocytów są drugą w kolejności izolowaną frakcją komórek glejowych. W warunkach normoksji fizjologicznej *in vitro* są zdolne do proliferacji, różnicowania oraz wydłużania i rozgałęziania swoich wypustek (**Rycina 14 A, B**). Znakowanie komórek markerami NG2, CNPazą, GalC, które są specyficzne dla kolejnych etapów różnicowania oligodendrocytów, umożliwiło wizualizację dojrzewających komórek o wydłużonych wypustkach i złożonej morfologii (**Rycina 14 C-F**). Poddanie OPCs procedurze OGD stymulowało proliferację komórek OPCs (wyznakowanych markerem Ki67) z  $8,6\pm 0,6\%$  w kontroli do  $10,9\pm 2,1\%$  w wariancie 24h po OGD ( $p < 0,001$ ) oraz z  $6,876\pm 3,03\%$  do  $8,93\pm 1,8\%$ , jak oszacowano po 48h hodowli ( $p < 0,05$ ) (**Rycina 14 G**). W kolejnych dniach hodowli oligodendrocyty hodowane w pożywce bez surowicy w warunkach normoksji fizjologicznej (w warunkach kontrolnych) nadal się dzieliły, jednakże proliferacja komórek kontrolnych zmniejszyła się z  $8,6\pm 0,6\%$  po 24h hodowli, do  $6,39\pm 1,1\%$  po 72h hodowli ( $p < 0,01$ ) (**Rycina 14 G**). Zaobserwowano również wzrost porliferacji komórek kontrolnych z  $6,39\pm 1,1\%$  po 72h hodowli do  $8,93\pm 0,008\%$  w 5 DIV ( $p < 0,01$ ) (**Rycina 14 G**).



**Rycina 14** Proliferujące i różnicujące się neonatalne szczurze oligodendrocyty *in vitro*. Zdjęcia przyżyciowe oligodendrocytów hodowanych 24h w warunkach bezsurowiczych, w normoksji fizjologicznej, wariant kontrolny (**A**) i wariant po OGD (**B**). (**C**, **D**) Zdjęcia przedstawiają dzielące się OPCs wyznakowane markerem Ki67 (kolor czerwony) oraz NG2 (kolor zielony), które są bardziej liczne po procedurze OGD. (**E**, **F**) Zdjęcia przedstawiają oligodendrocyty różnicujące się, prezentujące marker GalC (kolor zielony). Dodatkowo komórki proliferujące wyznakowane są znacznikiem Ki67 (kolor czerwony). Czasowe ograniczenie tlenu i glukozy wywiera negatywny wpływ na rozgałęzianie się komórek w procesie dojrzewania. Jądra komórkowe są uwidocznione za pomocą odczynnika Hoechst (niebieski). Skala odpowiada 50  $\mu\text{m}$ . (**G**) Graficzna prezentacja liczby oligodendrocytów w wariancie kontrolnym i poddanym procedurze OGD. Procedura OGD stymuluje proliferację komórek podczas pierwszych 48h w warunkach *in vitro*. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.0001$

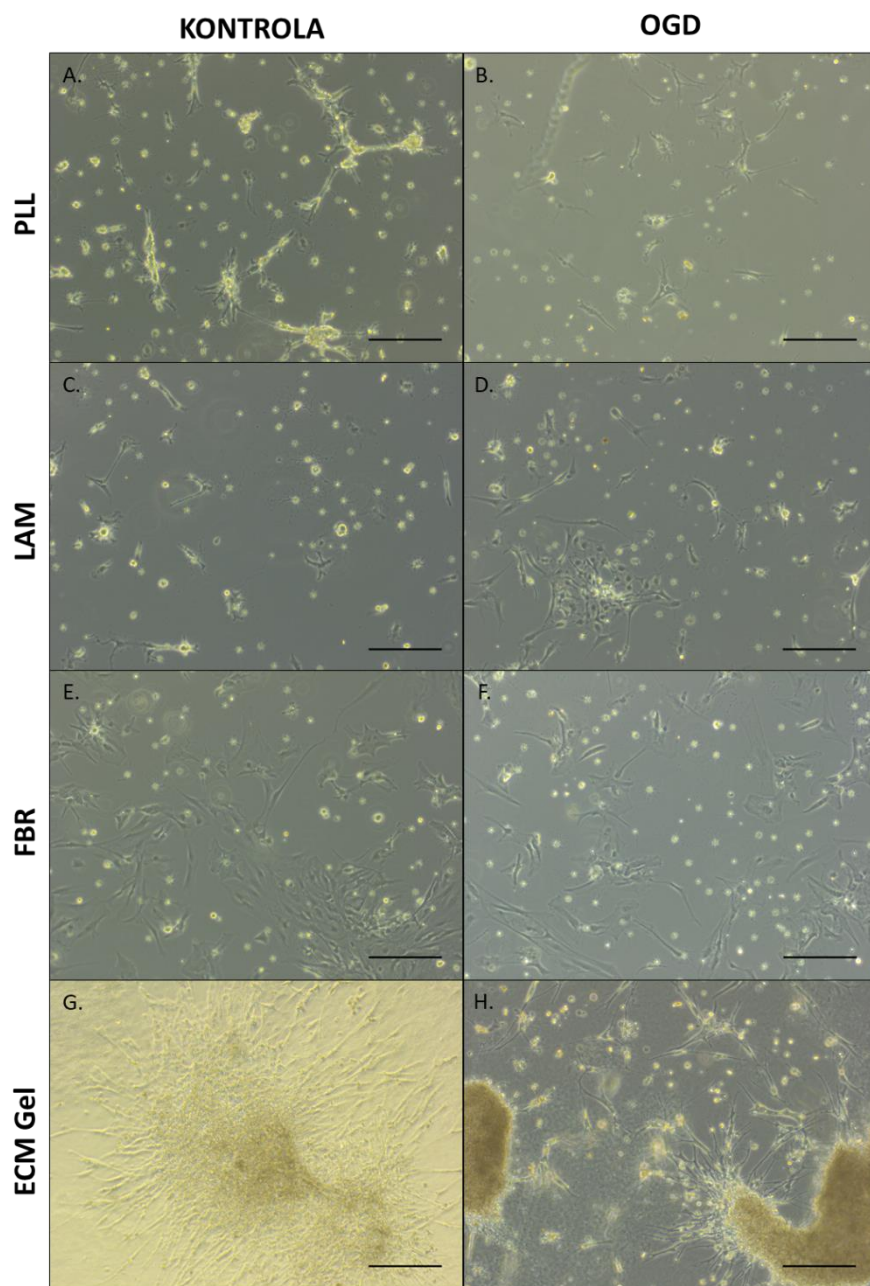
## Wpływ wybranych biomateriałów na hodowlę pierwotnych komórek glejowych *in vitro*

W celu sprawdzenia czy składniki przypominające fizjologiczne mikrośrodowisko komórkowe wywierają wpływ na hodowlę komórek w warunkach *in vitro*, komórki uzyskane z mózgów szczurów neonatalnych (n=33) wysiewano na powierzchnie pokryte jednym z wybranych związków biomimetycznych: lamininą, fibronektyną lub odczynnikiem ECM Gel (przypominającym składem macierz zewnątrzkomórkową i zawierającym m.in. lamininę, kolagen typu IV, proteoglikan siarczanu heparyny i entaktynę).

### Astrocyty

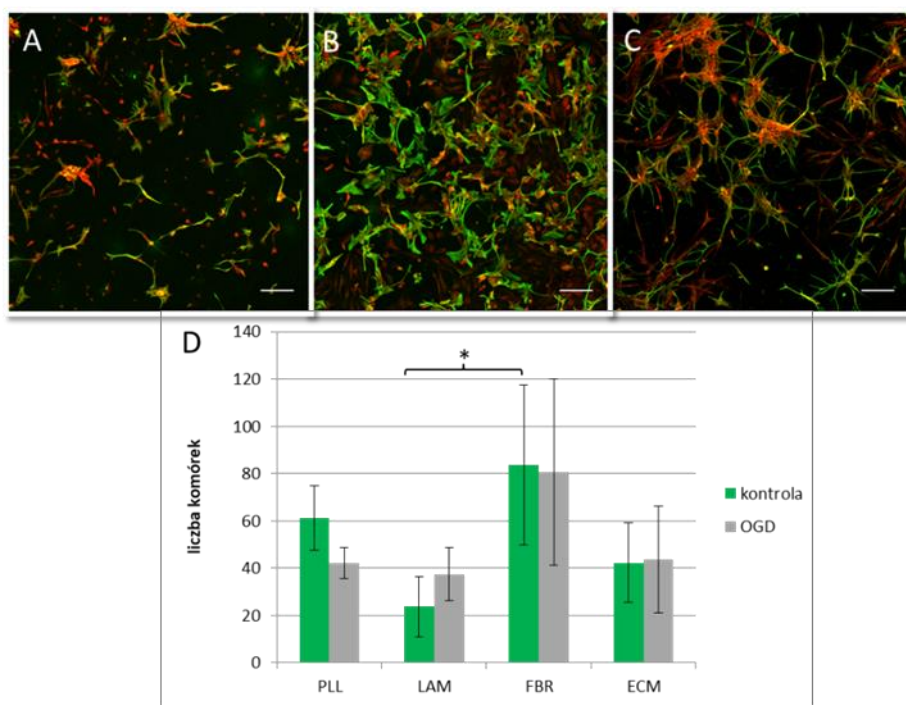
Astrocyty stanowią najliczniejszą frakcję glejową. Jak wykazano, najbardziej sprzyjająca hodowli astrocytów była płytka o większej powierzchni oczek hodowlanych (9,6 cm<sup>2</sup>). Wysianie na wspomnianą płytkę 6-cio dołkową, umożliwia czas hodowli astrocytów do 5 DIV.

Wykazano, że związki biomimetyczne zastosowane do pokrycia powierzchni naczyń hodowlanych w dużym stopniu wpływają na liczbę astrocytów (**Rycina 15 A-D**). W warunkach przyżyciowych zaobserwowano zagęszczenie komórek wysianych na powierzchnię pokrytą FBR, w porównaniu do PLL (**Rycina 15 A, C**). Ponadto, istotną obserwacją jest również zmiana morfologii komórek, w zależności od rodzaju podłoża. Komórki hodowane na fibronektynie (**Rycina 15 C**) charakteryzują się fibroblastycznym kształtem, w odróżnieniu od komórek wysianych na PLL (**Rycina 15 A**) czy LAM (**Rycina 15 B**), gdzie można zaobserwować zwartą cytoplazmę i bardziej smukły kształt komórek. Komórki hodowane na podłożu zawierającym ECM Gel tworzą charakterystyczne skupiska, którym towarzyszą również pojedyncze komórki (**Rycina 15 D**). W znakowanych astrocytach (GS<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup>) hodowanych na PLL, LAM lub ECM Gel liczba komórek była podobna. W przypadku FBR zaobserwowano wzrost gęstości komórek w wariacie kontrolnym o około 27% w stosunku do LAM (**Rycina 16**).



**Rycina 15** Przyżyciowe zdjęcia astrocytów neonatalnych, wysianych na płytkach hodowlanych pokrytych wybranymi związkami biomimetycznymi, hodowanych 24h w pożywce bezsurowiczej: **(A, B)** PLL; **(C, D)** LAM; **(E, F)** FBR; **(G,H)** ECM Gel. Skala odpowiada 200  $\mu\text{m}$ .





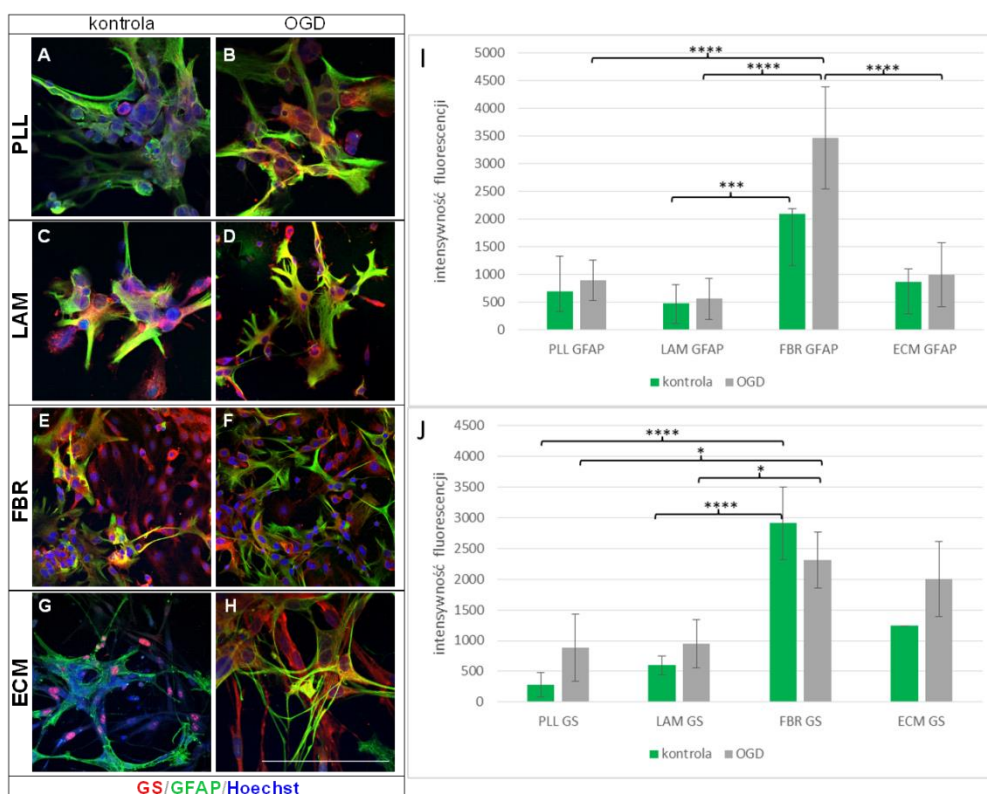
**Rycina 16** Neonatalne szczurze astrocyty ( $GS^+/GFAP^+$ ) hodowane przez 24h na powierzchniach pokrytych wybranymi związkami biomimetycznymi: lamininą (A), fibronektyną (B) i ECM Gel (C). Gęstość komórek zależy od zróżnicowanych właściwości adhezyjnych zastosowanych biomateriałów i jest największa w przypadku hodowli astrocytów na fibronektynie. Jądra komórkowe są wybarwione odczynnikiem Hoechst (niebieski). Skala odpowiada 50  $\mu m$ . (D) Liczba astrocytów w zależności od podłoża hodowlanego, liczona z kilku obszarów o rozmiarze 1214,6  $\mu m$  x 1214,6  $\mu m$ . \*  $p < 0.05$

Podjęto próbę hodowli astrocytów w dodatkowych wariantach: płytki pokryte wodorobromkiem poli-L-ornityny (3 mg/ml, Sigma Aldrich) zamiast PLL oraz wykorzystanie Serum Replacement (Sigma Aldrich), w stężeniach 2%, 5% i 10%, w pożywce hodowlanej zamiast FBS. We wszystkich powyższych wariantach doświadczalnych komórki nie przeżywały.

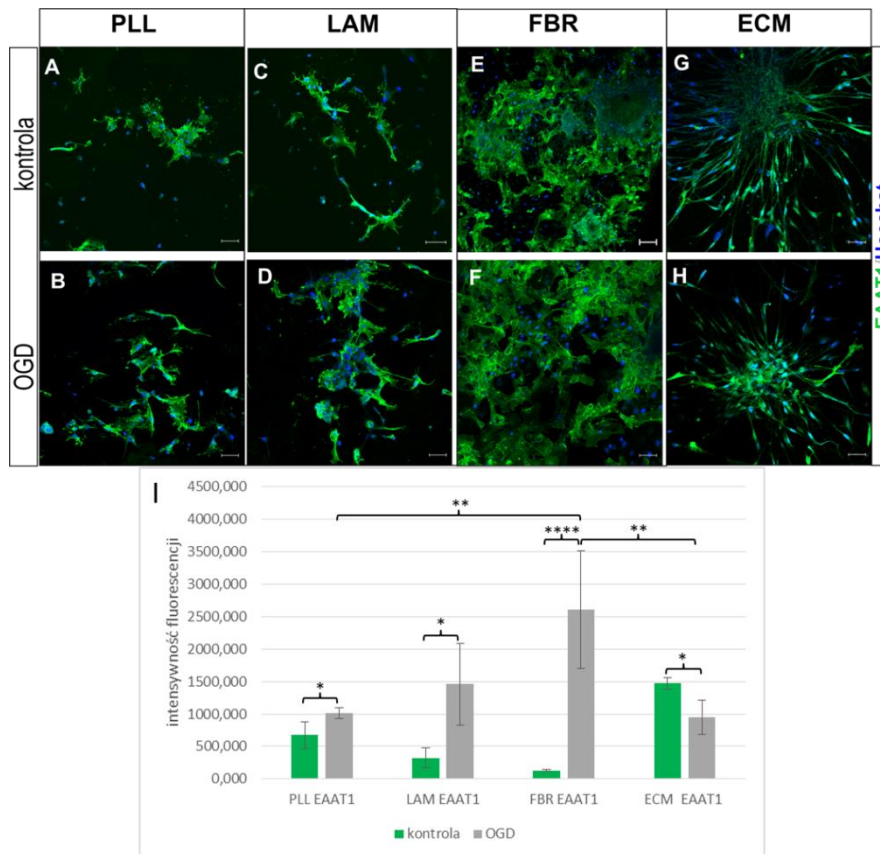
Jak wykazały uzyskane wyniki, właściwości adhezyjne związków użytych do pokrycia powierzchni hodowlanych wywierają istotny wpływ na ekspresję specyficznych dla astrocytów markerów (**Rycina 17 A-H**). Pierwszym markerem analizowanym za pomocą pomiaru intensywności fluorescencji był GFAP.

Analizy nie wykazały znaczących różnic w intensywności fluorescencji GFAP pomiędzy komórkami w wariantcie kontrolnym i po OGD, rosnącymi na płytkach hodowlanych pokrytych PLL. Zaobserwowano natomiast znaczący wzrost ekspresji GFAP ( $p < 0.0001$ ) w wariantcie po OGD: o około 390% (w porównaniu z PLL), gdy komórki były hodowane na fibronektynie i o 350% w porównaniu z komórkami hodowanymi na ECM Gel

**(Rycina 17 I).** Kolejnym analizowanym markerem astrocytów była syntetaza glutaminy (GS). Ekspresja tego markera wzrosła ponad 10-krotnie ( $p < 0.0001$ ) w komórkach hodowanych na FBR, w porównaniu do tych hodowanych na PLL oraz ponad 7-krotnie w przypadku komórek hodowanych na powierzchni pokrytej ECM Gel **(Rycina 17 J)**. W przypadku markera EAAT1 również zaobserwowano wyraźne różnice w jego ekspresji, w zależności od związku biomimetycznego użytego do pokrycia powierzchni hodowlanej. We frakcji poddanej OGD wykazano wzrost ekspresji EAAT1 o 150% w komórkach hodowanych na PLL, o 220% w komórkach hodowanych na LAM i aż o 2000% w komórkach hodowanych na FBR w stosunku do kontroli **(Rycina 18)**. Uzyskane wyniki podsumowano w **Tabeli 10**.



**Rycina 17** Wpływ biomateriałów stosowanych do pokrycia powierzchni płytek hodowlanych na ekspresję klasycznych markerów astrocytów: GS i GFAP w punkcie czasowym 24h. Podwójne znakowanie immunocytochemiczne astrocytów ( $GS^+/GFAP^+$ ) hodowanych na powierzchniach pokrytych PLL (A, B), lamininą (C, D), fibronektyną (E, F) lub ECM Gel (G, H). Jądra komórkowe wybarwione odczynnikiem Hoechst (niebieski). Pasek skali reprezentuje 50  $\mu m$ . (I) Analiza ekspresji markera GFAP w odniesieniu do biomateriałów użytych do hodowli komórek; (J) Pomiar ekspresji GS w astrocytach porastających powierzchnię pokrytą różnymi związkami biomimetycznymi. Ekspresja badanych markerów (GFAP i GS) zależy od biomolekuły użytej do pokrycia powierzchni hodowlanej. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$



**Rycina 18** Ekspresja EAAT1 w neonatalnych szczurzych astrocytach hodowanych przez 24h na płytkach hodowlanych pokrytych PLL (A, B); LAM (C, D); FBR (E, F) i ECM Gel (G, H). Skala odpowiada 50  $\mu$ m. (I) Pomiar ekspresji EAAT1 w astrocytach porastających powierzchnię pokrytą różnymi związkami biomimetycznymi. Jądra komórkowe wybarwiono odczynnikami Hoechst (niebieski).

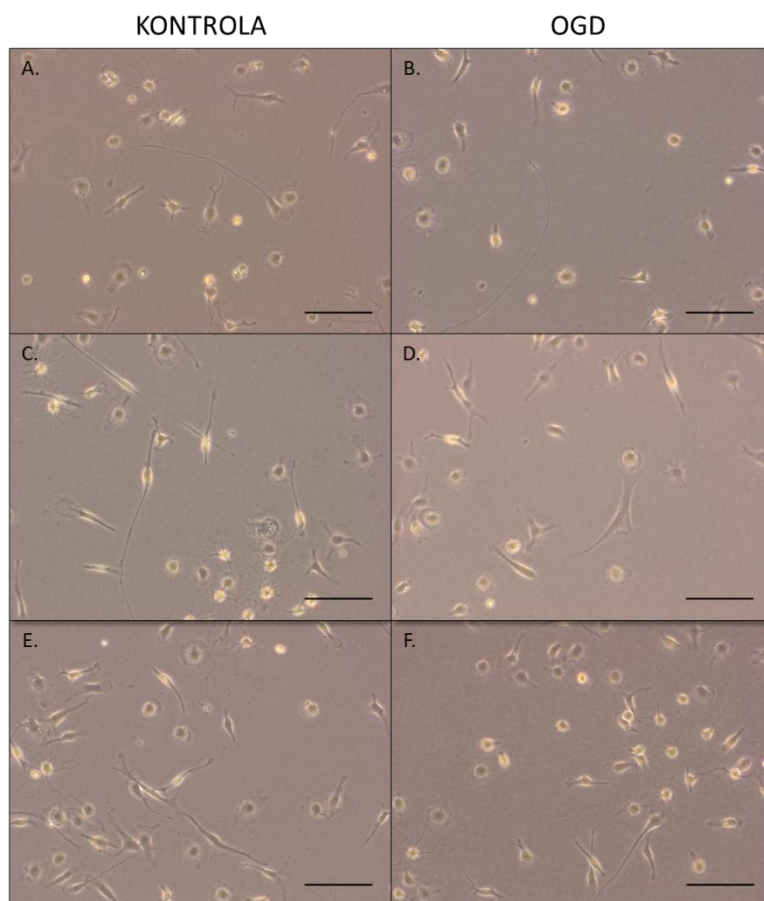
	gęstość komórek	GFAP	EAAT1	GS
PLL	-	-	↑	-
LAM	-	-	↑	-
FBR	-	↑	↑	-
ECM Gel	-	-	↓	↑

**Tabela 10** Podsumowanie wpływu hodowli na powierzchniach pokrywanych wybranymi czynnikami biomimetycznymi na ekspresję klasycznych znaczników astrocytarnych w szczurzych neonatalnych komórkach hodowanych w pożywce bezsurowiczej, po OGD. Objaśnienie skrótów: ↑: wzrost gęstości/ekspresji markera; ↓: spadek ekspresji markera; -: brak znaczących zmian.

## Progenitory oligodendrocytów

Uzyskane wyniki wskazują, że PLL, LAM i FBR zastosowane do pokrywania powierzchni hodowlanych nie wpływają znacząco na liczbę OPCs w punkcie czasowym 24h, w przeciwieństwie do ECM Gel, który okazał się środowiskiem niesprzyjającym dla przeżycia tych komórek. Nie zaobserwowano również znaczących zmian w morfologii progenitorów oligodendrocytów, które byłyby zależne od rodzaju podłoża (**Rycina 19**). W związku z zaobserwowanym przyżyciowo brakiem znamienego wpływu na liczbę komórek

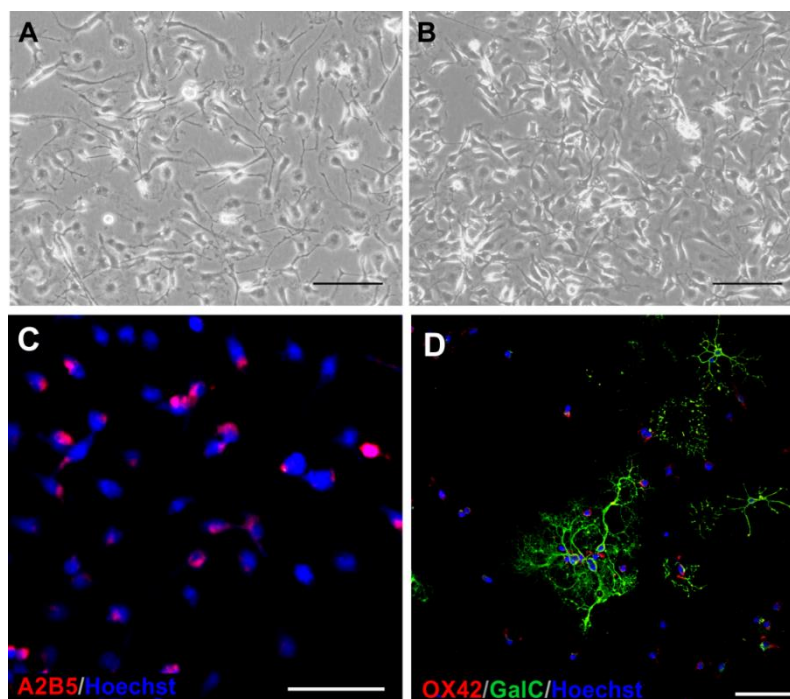
oraz ich dalsze różnicowanie *in vitro*, do hodowli szczurzych pierwotnych progenitorów oligodendrocytów w warunkach normoksji fizjologicznej i pożywkach bezsurowiczych stosowano PLL.



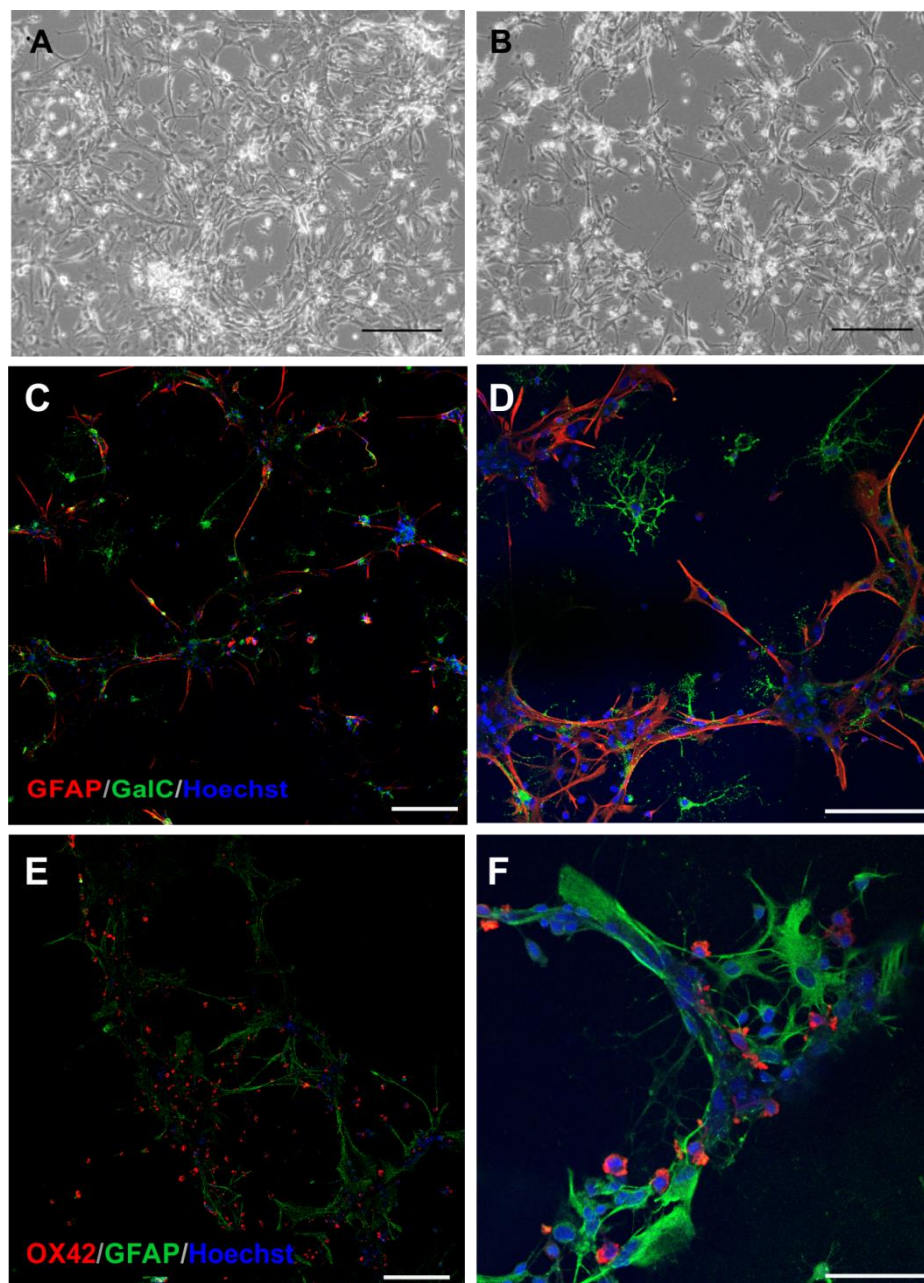
**Rycina 19** Przyżyciowe zdjęcia progenitorów oligodendrocytów. Zdjęcia przedstawiają komórki wysiane na wybrane biomateriały po 24h hodowli: (**A, B**) PLL; (**C, D**) LAM i (**E, F**) FBR. Komórki były hodowane w pożywce bez surowicy, na płytkach 24-dołkowych. Skala odpowiada 100  $\mu\text{m}$ .

## Wspólhodowle komórek glejowych

Wyizolowane frakcje poszczególnych typów komórek mogą być również wykorzystane w eksperymentach jako współhodowle, do badania interakcji komórkowych, w układzie bezpośrednim komórka-komórka. Metoda ta polega na umieszczeniu frakcji komórkowych na tej samej powierzchni hodowlanej. W przeprowadzonych eksperymentach wykorzystano model bezpośrednich współhodowli: oligodendrocytów z mikroglejem (**Rycina 20**), oligodendrocytów z astrocytami (**Rycina 21 A-D**) oraz astrocytów z mikroglejem (**Rycina 21 E, F**).



**Rycina 20** Wspólhodowla szczurzych neonatalnych oligodendrocytów i mikrogleju w punkcie czasowym 24h. (A) Zdjęcie przyżyciowe komórek wariantu kontrolnego; (B) Zdjęcie przyżyciowe komórek poddanych procedurze OGD; (C) Komórki wyznakowane przeciwciałem anti-A2B5 (czerwone), znakującym komórki neuralne, reprezentowane przez oligodendrocyty. Mikroglej pochodzenia mezenchymalnego pozostaje nieznakowany. (D) Różnicujące się, GalC-pozytywne oligodendrocyty (zielone), współhodowane z mikroglejem znakowanym markerem OX42 (czerwone). Jądra komórkowe są barwione odczynnikiem Hoechst (niebieski). Skala odpowiada 50  $\mu\text{m}$ .

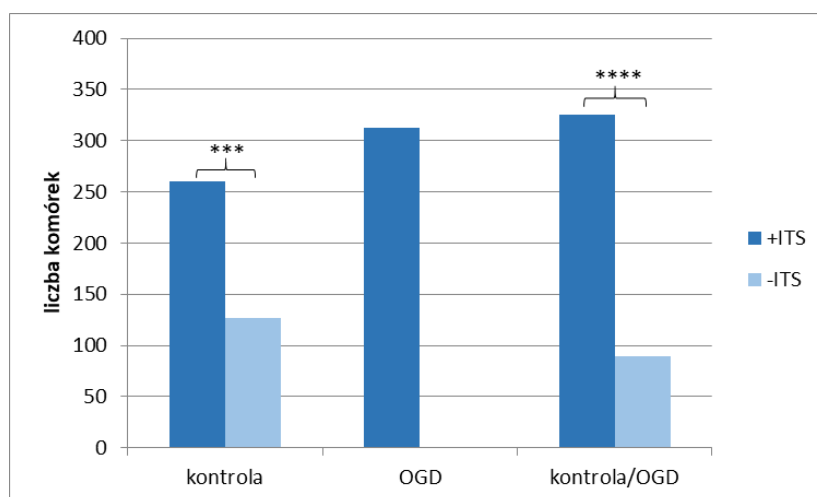


**Rycina 21** Współhodowla szczurzych neonatalnych astrocytów z mikroglejem lub oligodendrocytami. (A) Zdjęcie przyżyciowe współhodowli astrocyty-oligodendrocyty w wariacie kontrolnym; (B) Zdjęcie przyżyciowe współhodowli astrocyty-oligodendrocyty poddanej procedurze OGD; (C, D) Astrocyty (GFAP<sup>+</sup>, czerwony) współhodowane z różnicującymi się, mGalC-pozytywnymi (zielony) oligodendrocytami w warunkach kontrolnych w punkcie czasowym 24h. (E, F) Współhodowla mikroglej-astrocyty znakowana specyficznymi przeciwciałami, w celu rozróżnienia typu komórek we współhodowli: OX42 dla mikrogleju (czerwony) i GFAP dla astrocytów (zielony) po 24h hodowli. Komórki rosły w warunkach kontrolnych. Jądra komórkowe są barwione odczynnikiem Hoechst (niebieski). Skala odpowiada 50 μm.

Zastosowanie specyficznych, podstawowych warunków hodowli, takich jak pokrywanie powierzchni naczyń hodowlanych PLL oraz zastosowanie pożywki bezsurowiczej, suplementowanej jedynie ITS w przypadku oligodendrocytów, pozwala na hodowanie wszystkich trzech typów komórek glejowych do 7 DIV. We współhodowlach

zastosowano takie same warunki jak powyżej. Przeprowadzone analizy jednoznacznie wykazały, że dodatek ITS do pożywki hodowlanej zwiększa liczbę komórek we współhodowli mikrogleju z OPCs (**Rycina 22**). W wariancie po OGD bez ITS nie udało się uzyskać reprezentatywnej liczby komórek/powtórzeń ze względu na słabą przeżywalność komórek w tym wariancie eksperymentalnym.

Dzięki zastosowaniu markerów specyficznych dla poszczególnych typów komórek, frakcje mogły być rozróżniane i dalej badane w kontekście ich podstawowych procesów, np. zmiany morfologii, przeżycia i różnicowania. Ponadto, różne warianty doświadczalne współhodowli pozwalają na prowadzenie badań nad oceną komunikacji i współzależności międzykomórkowej.



**Rycina 22** Graficzne przedstawienie wpływu suplementacji ITS na liczbę komórek we współhodowli mikrogleju z OPCs po 72h hodowli. Dodatek ITS do pożywki hodowlanej znacząco zwiększa liczbę komórek we wszystkich wariantach współhodowli. Liczba komórek liczona z kilku obszarów o rozmiarze 1214,6  $\mu\text{m}$  x 1214,6  $\mu\text{m}$ . \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$

## **Analiza sekretomu oraz ekspresji wybranych czynników w komórkach glejowych**

Zastosowane warunki hodowli (pożywka bezsurowicza, normoksja fizjologiczna) sprzyjają badaniu sekretomu komórek glejowych. Pożywki hodowlane, zbierane z poszczególnych wariantów eksperymentalnych w wybranych punktach czasowych służyły do przeprowadzania oznaczeń technikami immunoenzymatycznymi typu ELISA i Luminex, jak wyszczególniono w **Tabeli 7** i **Tabeli 8**. W pierwszej kolejności zbadano wydzielanie przez komórki glejowe czynników troficzych kluczowych dla różnicowania oligodendrocytów oraz o działaniu neuroprotekcynnym (IGF-1, BDNF).

### **Czynniki troficzne**

#### ***IGF-1***

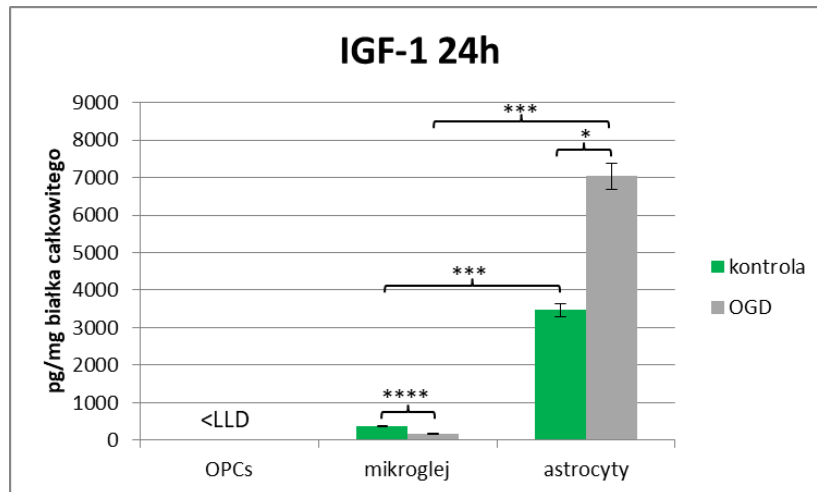
Przeprowadzone badania pokazały, że poziom ekspresji IGF-1 zależy od typu komórek glejowych. Zmierzone stężenie IGF-1 w pożywkach, w których hodowano astrocyty było znacznie wyższe niż w pożywkach, w których hodowano pozostałe komórki glejowe, zarówno w punkcie czasowym 24h (**Rycina 23**), jak i 72h (**Rycina 24**).

Wydzielanie IGF-1 przez astrocyty, mierzone po 24 godzinach hodowli, w wariancie po OGD było ponad 2-krotnie wyższe w porównaniu do wariantu kontrolnego (3465,59 pg/mg vs. 7038,77 pg/mg). Odwrotną tendencję zaobserwowano natomiast w pożywkach pochodzących z hodowli mikrogleju, gdzie w wariancie kontrolnym zaobserwowano ponad 2-krotnie wyższy poziom wydzielanego IGF-1 w stosunku do wariantu po OGD (379,77 pg/mg vs. 175,75 pg/mg). Ponadto, w wariancie kontrolnym, ilość IGF-1 wydzielanego przez astrocyty jest 9-krotnie wyższa w porównaniu do ilości wydzielanej przez komórki mikrogleju (3465,59 pg/mg vs. 379,77 pg/mg). Podobną tendencję zaobserwowano w wariancie po OGD, gdzie ilość IGF-1 wydzielanego przez astrocyty jest aż 40-krotnie większa (7038,77 pg/mg vs. 175,75). Po 24h hodowli w pożywkach, w których hodowano OPCs nie wykryto IGF-1.

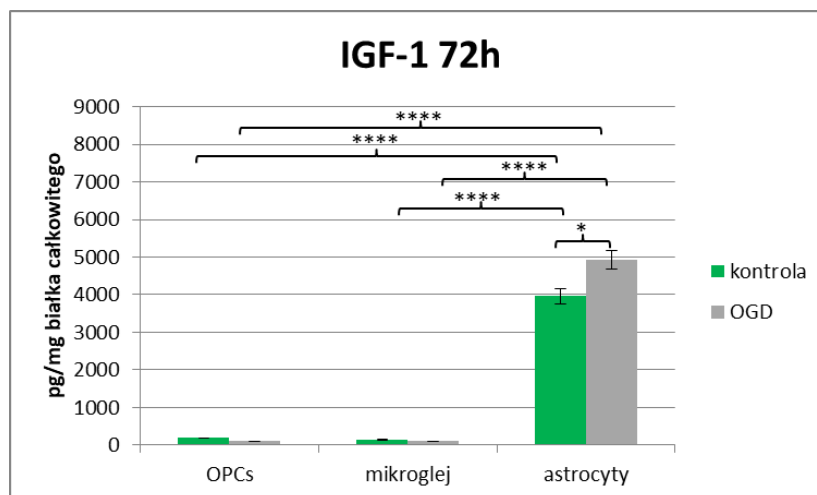
Po 72h w pożywkach, w których hodowano astrocyty ilość IGF-1 spada w porównaniu do ilości wydzielanej przez te komórki po 24h; niemniej poziom ten nadal jest wyższy w wariancie po OGD (4926,69 pg/mg vs. 3963,60 pg/mg). W pozostałych frakcjach komórkowych odnotowano odwrotną tendencję. Ilość IGF-1 wydzielanego przez astrocyty kontrolne do pożywki hodowlanej jest większa 27-krotnie (3963,60 pg/mg vs. 144,15 pg/mg)



w porównaniu do ilości wydzielanej przez mikroglej i 21-krotnie (3963,60 pg/mg vs. 185,67 pg/mg) w porównaniu do nadsączy hodowlanych, w których rosły OPCs. W wariancie po OGD ilość IGF-1 wydzielanego przez astrocyty jest niemal 48-krotnie wyższa niż w pożywkach, w których hodowano mikroglej (4926,69 pg/mg vs. 100,79 pg/mg) czy OPCs (4926,69 pg/mg vs. 102,74 pg/mg).



**Rycina 23** Poziom IGF-1 w pożywkach, w których hodowano OPCs, mikroglej i astrocyty, mierzony po 24h od wysiania. SD wyrażono jako wartość procentową; LLD – dolna granica wykrywalności; \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$



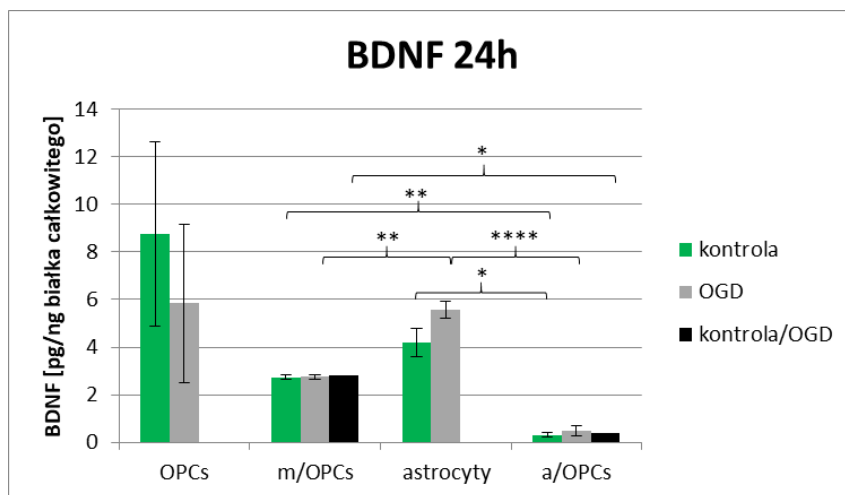
**Rycina 24** Poziom IGF-1 w pożywkach, w których hodowano OPCs, mikroglej i astrocyty, mierzony po 72h od wysiania. SD wyrażono jako wartość procentową; \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$

## ***BDNF***

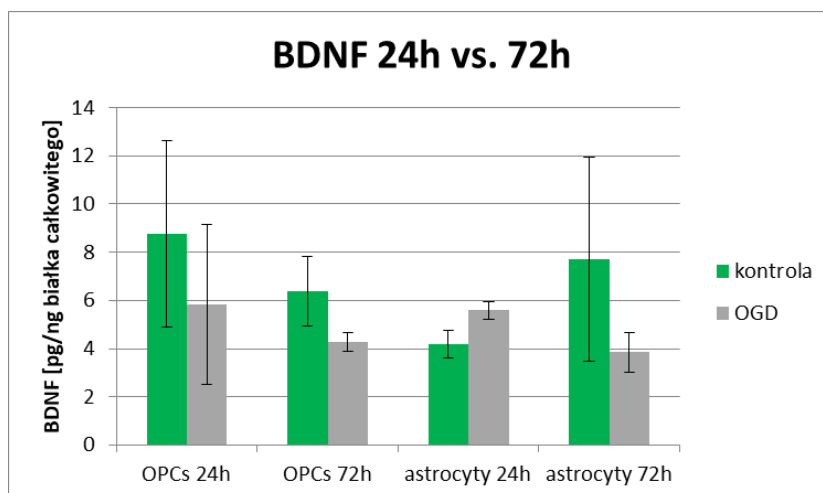
Mając na uwadze istotne różnice w ilości IGF-1 wydzielanego przez badane frakcje glejowe, zarówno w warunkach kontrolnych, jak i pod wpływem OGD, postanowiono zbadać kolejny czynnik troficzny, jakim jest BDNF. Jak wykazano, poziom tego czynnika nawet w

zagęszczanych pożywkach zebranych po hodowli komórek glejowych jest na granicy lub poniżej progu wykrywalności testu, zarówno po 24h hodowli, jak po 72h. W związku z powyższym postanowiono oznaczyć stężenie wewnątrzkomórkowego BDNF.

W przeprowadzonych oznaczeniach wykazano ekspresję BDNF w OPCs, astrocytach oraz we współhodowlach OPCs z mikroglejem i astrocytami. Przeprowadzone badania pokazują, że poziom ekspresji BDNF jest niższy we współhodowlach niż w monofrakcjach komórek glejowych (**Rycina 25**). Poziom ekspresji BDNF w astrocytach w wariancie kontrolnym jest prawie 14-krotnie wyższy w stosunku do współhodowli OPCs z astrocytami (4,18 pg/ng vs. 0,30 pg/ng). W wariancie poddanym procedurze OGD, zaobserwowano podobną tendencję: poziom ekspresji czynnika jest ponad 11-krotnie wyższy w monofrakcji w porównaniu do współhodowli (5,58 pg/ng vs. 0,49 pg/ng). Ponadto, ekspresja BDNF w wariancie kontrolnym we współhodowli OPCs z mikroglejem jest 9-krotnie wyższa w stosunku do współhodowli OPCs z astrocytami (2,74 pg/ng vs. 0,30 pg/ng). Podobną tendencję zaobserwowano w wariancie, gdzie obie frakcje we współhodowli poddano procedurze OGD; poziom ekspresji czynnika we współhodowli OPCs z mikroglejem jest ponad 5-krotnie wyższy niż we współhodowli OPCs z astrocytami (2,74 pg/ng vs. 0,49 pg/ng). W wariancie, gdzie tylko OPCs poddano procedurze OGD, odnotowano porównywalną tendencję do wariantu, gdzie obie frakcje poddano procedurze OGD: poziom ekspresji BDNF we współhodowli OPCs z mikroglejem jest ponad 7-krotnie wyższy w porównaniu do współhodowli OPCs z astrocytami (2,80 pg/ng vs. 0,38 pg/ng). Ponadto, zaobserwowano ogólny spadek poziomu ekspresji BDNF po 72h hodowli w porównaniu do 24h w OPCs (**Rycina 26**). W astrocytach ekspresja BDNF różni się zarówno w czasie, jak i w zależności od warunków eksperymentalnych: w wariancie kontrolnym odnotowano wzrost ekspresji po 72h vs. 24h, natomiast w wariancie po OGD zaobserwowano odwrotną tendencję (**Rycina 26**).



**Rycina 25** Poziom ekspresji BDNF w monofrakcjach komórek glejowych oraz we współodwzajemnościach OPCs z mikroglejem i astrocytami w punkcie czasowym 24h. Skróty: m/OPCs – współodwzajemność mikrogleju z OPCs; a/OPCs – współodwzajemność astrocytów z OPCs. W wariancie kontrola/OGD tylko OPCs poddano procedurze OGD. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

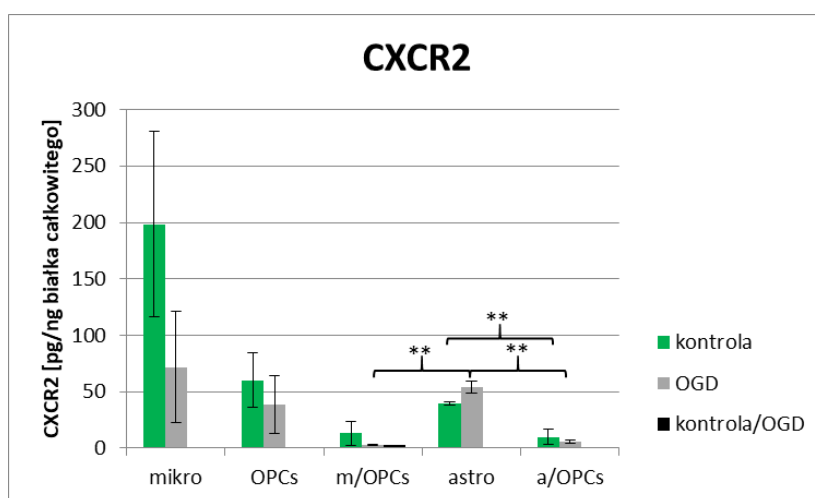


**Rycina 26** Poziom ekspresji BDNF w monofrakcjach komórek glejowych odpowiednio po 24 i 72 godzinach hodowli.

## Ekspresja receptorów chemokin: CXCR2 oraz CXCR4

Analiza wyników ekspresji wybranych czynników troficznych, wskazuje na aktywną odpowiedź komórek glejowych na okresowy niedobór glukozy i tlenu. Dlatego też w kolejnym etapie badań określono, czy OGD wpływa na ekspresję kilku kluczowych cytokin/chemokin oraz ich receptorów w badanych komórkach. W pierwszej kolejności postanowiono ocenić ekspresję wybranych kluczowych receptorów chemokinowych, odgrywających rolę zarówno w migracji komórek, jak i w modulacji procesu ich różnicowania.

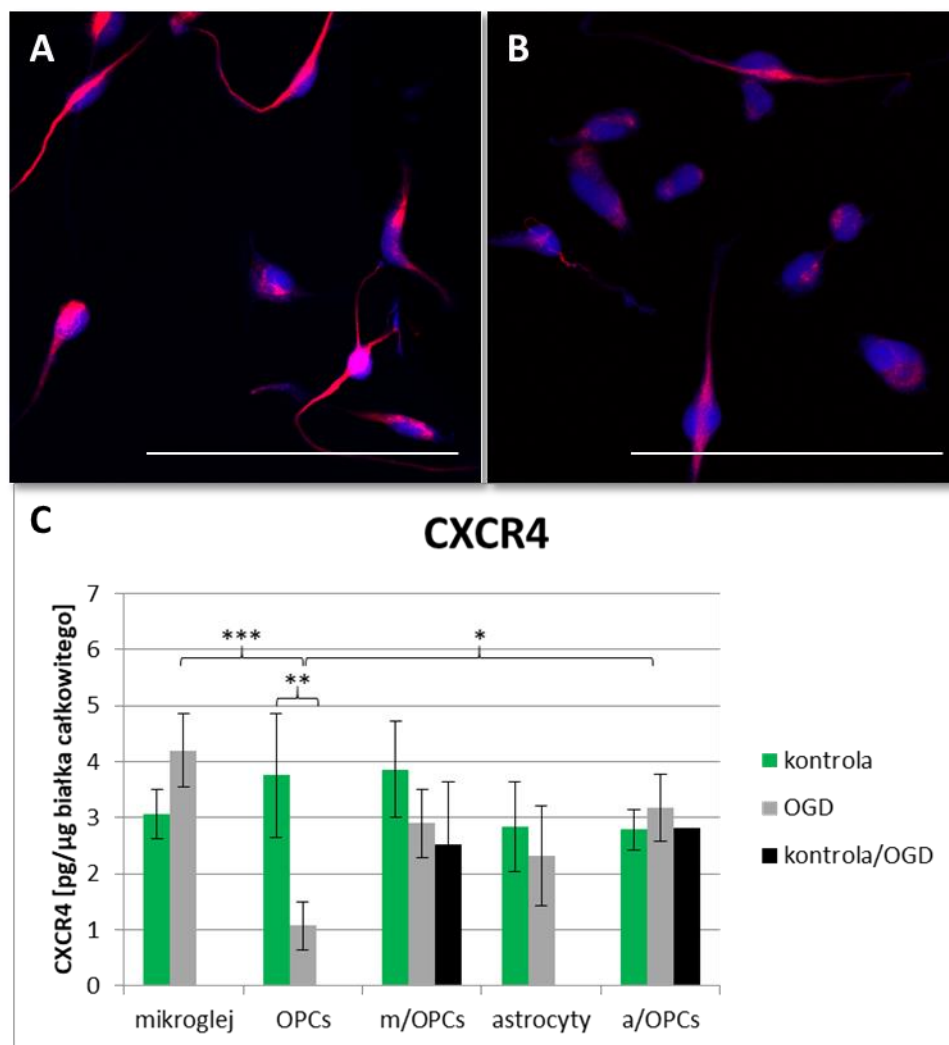
Jednym z najistotniejszych receptorów w procesie rozwoju układu nerwowego jest receptor chemokinowy 2 z motywem C-X-C (CXCR2). Jak wykazano dzięki zastosowaniu ultraczułych metod analizy ilościowej ekspresja CXCR2 w komórkach mikrogleju i OPCs jest niższa w wariancie po OGD w stosunku do kontroli, natomiast w astrocytach zaobserwowano odwrotną tendencję. Ponadto, wykazano wyraźny spadek ekspresji receptora we współhodowlach, w porównaniu do monofrakcji. Poziom ekspresji CXCR2 w astrocytach kontrolnych jest niemal 4-krotnie wyższy niż we współhodowli astrocytów z OPCs (39,35 pg/ng vs. 9,95 pg/ng) oraz ponad 9-krotnie wyższy w astrocytach w wariancie po OGD w porównaniu do współhodowli (54,24 pg/ng vs. 5,80 pg/ng) (**Rycina 27**).



**Rycina 27** Poziom ekspresji CXCR2 w monofrakcjach komórek glejowych oraz we współhodowlach OPCs z mikroglejem i astrocytami po 24h hodowli. Skróty: mikro – mikroglej; m/OPCs – współhodowla mikrogleju z OPCs; astro – astrocyty; a/OPCs – współhodowla astrocytów z OPCs. W wariancie kontrola/OGD tylko OPCs poddano procedurze OGD. \*\*p<0.01

Innym kluczowym receptorem w biologii komórek oligodendrocytarnych jest receptor chemokinowy 4 z motywem C-X-C (CXCR4). Ze względu na jego udział w odpowiedzi OPCs na czynniki obecne w lokalnym mikrośrodowisku, poddano ocenie ilościowej ekspresję wymienionego receptora w OPCs, a także we wszystkich badanych frakcjach komórek glejowych i ich współhodowlach. Przeprowadzone badania wykazały ekspresję receptora CXCR4 we wszystkich wariantach eksperymentalnych. W wariancie po OGD poziom ekspresji był wyższy we współhodowlach niż w OPCs i astrocytach, natomiast niższy niż w mikrogleju. Poziom ekspresji CXCR4 w OPCs jest ponad 3-krotnie niższy po OGD w stosunku do kontroli (1,08 pg/μg vs. 3,76 pg/μg) (**Rycina 28**). Ponadto, poziom ekspresji receptora w OPCs w wariancie po OGD jest prawie 4-krotnie niższy w porównaniu do mikrogleju (1,08 pg/μg vs. 4,20 pg/μg) oraz 3-krotnie niższy w porównaniu do współhodowli astrocytów z OPCs (1,08 pg/μg vs. 3,18 pg/μg) (**Rycina 28**).

Wyniki analizy biochemicznej dodatkowo potwierdzone zostały poprzez znakowanie przeciwciałami specyficznymi dla CXCR4. Analiza barwień immunocytochemicznych potwierdziła obniżoną ekspresję CXCR4 na powierzchni OPCs po 72h hodowli po OGD w porównaniu do kontroli.



**Rycina 28** Poziom ekspresji CXCR4 w monofrakcjach komórek glęjowych oraz we współhodowlach OPCs z mikroglejem i astrocytami. Znakowanie receptora CXCR4 (czerwony) w OPCs po 72h hodowli w warunkach kontrolnych (A) oraz po OGD (B); jądra komórkowe wyznakowano odczynnikiem Hoechst (niebieski). Komórki poddane procedurze OGD są mniej zaawansowane w procesie różnicowania: w wariancie po OGD po 24h hodowli zaobserwowano głównie bipolarne OPCs lub komórki z krótkimi wypustkami. Skala odpowiada 50 μm. (C) Graficzne przedstawienie poziomu ekspresji CXCR4 po 24h hodowli. Skróty: m/OPCs – współhodowla mikrogleju z OPCs; a/OPCs – współhodowla astrocytów z OPCs. W wariancie kontrola/OGD tylko OPCs poddano procedurze OGD. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001

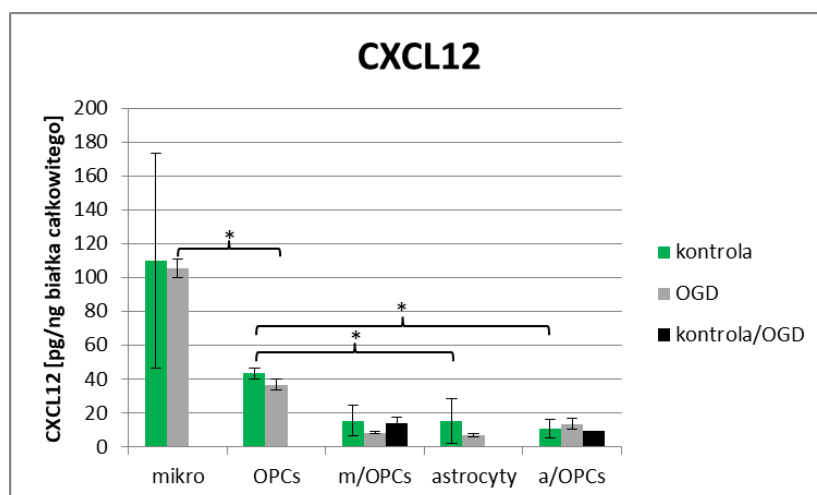
## Ocena ekspresji wybranych cytokin

Zróznicowany wpływ OGD na ekspresję wybranych receptorów w komórkach glęjowych skłania do postawienia pytania o zmiany w ekspresji kluczowych, wybranych

cytokin, ze szczególnym uwzględnieniem tych zaangażowanych w fizjologiczne funkcjonowanie komórek glejowych i modulację stanu zapalnego, rozwijającego się po uszkodzeniu hipoksyjno-ischemicznym. Ze względu na zaobserwowane istotne statystycznie zmiany w ekspresji receptora CXCR4 pod wpływem OGD zarówno w OPCs, jak i we współhodowli OPCs z astrocytami, w pierwszej kolejności ilościowo oceniono poziom liganda chemokinowego 12 z motywem C-X-C (CXCL12), oddziałującego m.in. przez wymieniony receptor.

## **CXCL12**

Poziom ekspresji CXCL12 w mikrogleju po OGD jest prawie 3-krotnie wyższy niż w OPCs po OGD (105,50 pg/ng vs. 36,91 pg/ng) (**Rycina 29**). Ponadto, poziom ekspresji CXCL12 w kontroli, w OPCs jest prawie 3-krotnie wyższy niż w astrocytach (43,54 pg/ng vs. 15,61 pg/ng) i 4-krotnie wyższy niż w wariancie kontrolnym we współhodowli astrocytów z OPCs (43,54 pg/ng vs. 10,78 pg/ng).

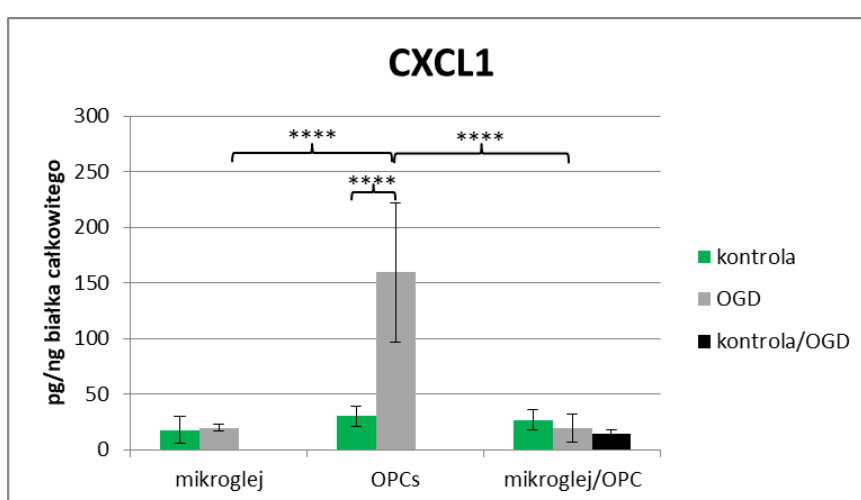


**Rycina 29** Graficzne przedstawienie poziomu ekspresji CXCL12 po 24h hodowli. Skróty: mikro – mikroglej; m/OPCs – współhodowla mikrogleju z OPCs; astro – astrocyty; a/OPCs – współhodowla astrocytów z OPCs. W wariancie kontrola/OGD tylko OPCs poddano procedurze OGD. \* $p < 0.05$

Mając na uwadze zaobserwowane zmiany ekspresji na poziomie białka drugiego z badanych receptorów, tj. CXCR2, podjęto się określenia poziomu czynników odpowiednio liganda chemokinowego 1 z motywem C-X-C (CXCL1) oraz liganda chemokinowego 8 z motywem C-X-C (CXCL8) w monofrakcjach OPCs i mikrogleju oraz w ich współhodowli. Mikroglej i OPCs są to dwie główne frakcje zaangażowane w modulowanie wzajemnej odpowiedzi immunologicznej.

## CXCL1

CXCL1 pełni ważną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej, będąc chemoatraktantem dla komórek immunologicznych. W pożywkach, w których hodowano OPCs zauważono wyższy poziom CXCL1 niż w pożywkach hodowlanych, w których hodowano mikroglej i współhodowlę mikrogleju z OPCs (**Rycina 30**). W OPCs w wariancie po OGD poziom CXCL1 jest ponad 5-krotnie wyższy w porównaniu do wariantu kontrolnego (159,66 pg/ng vs. 30,27 pg/ng). Ponadto, w OPCs w wariancie po OGD zaobserwowano 8-krotnie wyższy poziom CXCL1 niż w mikrogleju (159,66 pg/ng vs. 19,40 pg/ng) czy współhodowli mikrogleju z OPCs (159,66 pg/ng vs. 19,42 pg/ng).



**Rycina 30** Poziom CXCL1 w pożywkach, w których hodowano mikroglej, OPCs i ich współhodowlę przez 24h. W wariancie kontrola/OGD tylko OPCs poddano procedurze OGD. \*\*\*\*p<0.0001

Jak wykazano poprzez analizę ultraczułymi technikami biochemicznymi z wykorzystaniem zagęszczonych pożywek hodowlanych, ilości CXCL8 wydzielane przez neonatalne komórki glejowe oscylowały w granicach czułości zestawu do oznaczania, dlatego nie zostały wzięte pod uwagę. Wysoka czułość (<12.8 pg/ml) zastosowanych zestawów do oznaczania tej chemokiny wskazuje jednak, że poziom jej sekrecji przez neonatalne komórki glejowe pozostaje na relatywnie niskim poziomie.

Mając na uwadze powyższe wyniki wskazujące zarówno na wpływ OGD na ekspresję wybranych czynników jak i ich receptorów, modulowany we współhodowlach poprzez wpływ innych frakcji glejowych, postanowiono ocenić poziom dodatkowych czynników, zarówno w monofrakcjach glejowych, jak i w ich współhodowlach.

### ***GM-CSF, CXCL10, CCL2, CCL3***

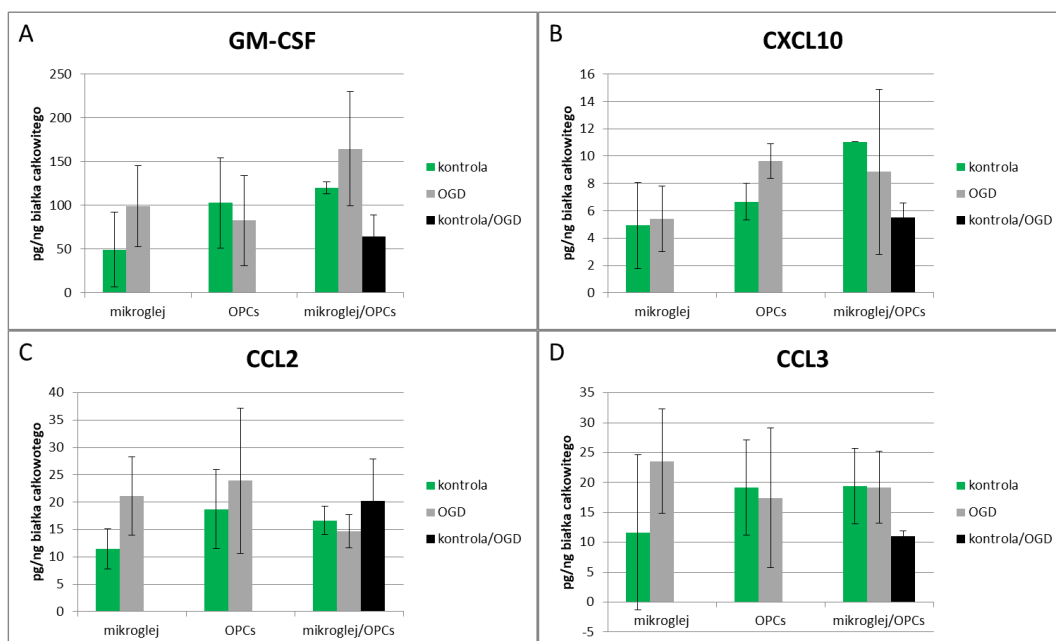
Jednym z ważnych czynników mających wpływ na przeżycie makrofagów oraz stan zapalny jest GM-CSF. W pożywkach hodowlanych, w których hodowano mikroglej, OPCs oraz współhodowlę mikrogleju z OPCs wykazano obecność tego czynnika (**Rycina 31 A**). W pożywkach, w których hodowano mikroglej, jak również we współhodowli mikrogleju z OPCs zaobserwowano wyższy poziom GM-CSF w wariancie, gdzie obie frakcje poddano procedurze OGD w stosunku do kontroli. Ponadto, we współhodowli odnotowano spadek poziomu tej cytokiny w wariancie, gdzie tylko OPCs poddano procedurze OGD. Obserwowane różnice nie wykazywały jednak znamienności statystycznej.

Kolejnym badanym czynnikiem, będącym chemoatraktantem dla makrofagów, mającym wpływ na migrację komórek mikrogleju jest CXCL10. W pożywkach, w których hodowano OPCs poziom tej chemokiny jest wyższy w wariancie po OGD w porównaniu do kontroli (**Rycina 31 B**). Odwrotną tendencję zaobserwowano w pożywkach hodowlanych, w których hodowano współhodowlę mikrogleju z OPCs, gdzie poziom CXCL10 w wariancie kontrolnym jest wyższy niż w obu wariantach po OGD (OGD, K/OGD), jednak podobnie jak wyżej, odnotowane różnice nie są statystycznie znamienne.

CCL2 jest kolejną przebadaną chemokiną, produkowaną przez mikroglej aktywowany, odpowiedzialną za rekrutację makrofagów w miejsce uszkodzenia. Jak wykazano, ilość CCL2 wydzielanej przez mikroglej jest wyższa w wariancie po OGD w porównaniu do wariantu kontrolnego (**Rycina 31 C**). Natomiast poziom CCL2 we współhodowli mikrogleju z OPCs jest niższy niż w pożywkach, w których hodowano OPCs. Ponadto, odnotowano nieznacznie wyższy poziom CCL2 w wariancie K/OGD w porównaniu do wariantu OGD i wariantu kontrolnego (**Rycina 31 C**).

We wszystkich analizowanych nadsączach hodowlanych, w których rosły komórki glejowe wykazano obecność liganda chemokinowego 3 z motywem C-C (CCL3) (**Rycina 31 D**). Chemokina ta jest ważnym czynnikiem dla prawidłowego funkcjonowania oligodendrocytów. W przeprowadzonych analizach wykazano, że ilość CCL3 wydzielanej przez mikroglej jest wyższa w wariancie po OGD w porównaniu do wariantu kontrolnego. We współhodowli, ilość CCL3 utrzymuje się na podobnym poziomie w wariancie kontrolnym i w wariancie OGD, natomiast w wariancie K/OGD jest nieco niższa.





**Rycina 31** Stężenie wybranych chemokin: **(A)** GM-CSF; **(B)** CXCL10; **(C)** CCL2; **(D)** CCL3 w pożywkach, w których hodowano mikroglej, OPCs i ich współhodowlę przez 24h. W wariancie kontrola/OGD tylko OPCs poddano procedurze OGD.

## *IL1 $\beta$ , IL6, IL10*

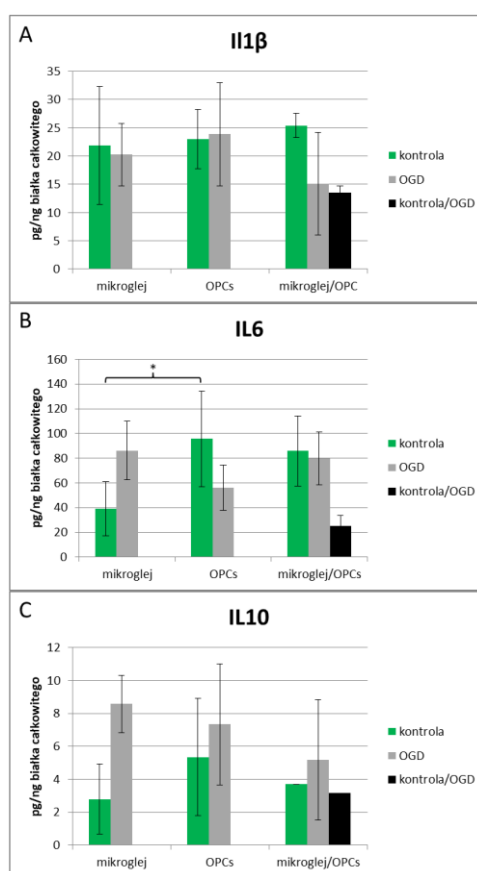
Jak wykazano w powyższych badaniach, mikroglej i OPCs wydzielają szereg chemokin do pożywki hodowlanej. Aby uzyskać pełniejszy obraz odpowiedzi komórek glejowych na czasowy niedobór tlenu i glukozy, postanowiono również sprawdzić, czy i na jakim poziomie komórki mikrogleju, OPCs i ich współhodowla, wydzielają wybrane, kluczowe dla odpowiedzi immunologicznej, interleukiny.

Jedną z najważniejszych interleukin, jest prozapalna IL-1 $\beta$ , syntetyzowana i wydzielana m.in. przez mikroglej. Jak wykazano w przeprowadzonych eksperymentach, w badanych frakcjach komórkowych ilość IL1 $\beta$  w pożywkach, w których hodowano OPCs, mikroglej i ich współhodowlę odnotowano na podobnym poziomie (**Rycina 32 A**). Nieznaczny spadek zaobserwowano w obu wariantach po OGD (OGD, K/OGD) we współhodowli, w stosunku do kontroli.

Makrofagi wydzielają również IL6, która może pełnić dualistyczną rolę, jako cytokina pro- lub przeciwzapalna. We wszystkich analizowanych nadsączach hodowlanych, w których hodowano komórki glejowe wykazano obecność IL-6 (**Rycina 32 B**). Ilość IL-6 wydzielanej przez OPCs w wariancie kontrolnym jest ponad 2-krotnie wyższa niż w pożywkach, w których hodowano mikroglej (95,71 pg/ng vs. 39,02 pg/ng). Ponadto, zaobserwowano, że w pożywkach, w których hodowano mikroglej ilość IL-6 jest wyższa w wariancie po OGD w

porównaniu do kontroli, natomiast w pożywkach, w których hodowano OPCs odnotowano odwrotną tendencję. Natomiast ilość IL-6 wydzielanej przez współhodowlę mikrogleju z OPCs jest niższa w wariancie K/OGD w porównaniu do wariantu OGD i wariantu kontrolnego.

Kolejną analizowaną interleukiną, jest IL10 o profilu przeciwzapalnym, mająca wpływ na polaryzację mikrogleju. We wszystkich analizowanych próbkach zaobserwowano wyższy poziom IL-10 w wariancie po OGD w porównaniu do wariantu kontrolnego (**Rycina 32 C**). Natomiast w pożywkach hodowlanych, w których hodowano współhodowlę poziom IL10 w wariancie K/OGD był niższy niż w wariancie OGD.



**Rycina 32** Stężenie wybranych interleukin: (A) IL1 $\beta$ ; (B) IL6; (C) IL10 w pożywkach, w których hodowano mikroglej, OPCs i ich współhodowlę w przez 24h. W wariancie kontrola/OGD tylko OPCs poddano procedurze OGD. \*p<0.05

## Dyskusja

### Wpływ hipoksji-ischemii *in vitro* na komórki glejowe

Model asfiksji neonatalnej *in vitro* z wykorzystaniem pierwotnej hodowli glejowej mieszanej ma na celu jak najbliższe odwzorowanie warunków fizjologicznych dzięki stosowaniu bezsurowiczej pożywki hodowlanej oraz ustalonych warunków tlenowych. Opisany rodzaj hodowli pozwala wykluczyć obecność czynników, które mogłyby wpływać na wyniki uzyskiwane w badanym modelu, przede wszystkim surowicę o zmiennym, niezidentyfikowanym składzie i stężeniu czynników aktywnych. Co istotne, w przeprowadzonych badaniach komórki hodowaliśmy w normoksji fizjologicznej (5% O<sub>2</sub>), odwzorowującej warunki tlenowe cechujące tkankę nerwową [101–105]. Stosowany dotąd standardowo w badaniach *in vitro* tlen atmosferyczny znacząco wpływa zarówno na proliferację, jak i starzenie komórek [3,104].

Kolejnym istotnym aspektem prowadzonych hodowli jest pozyskiwanie wszystkich trzech frakcji glejowych z tego samego mózgu oseska, co znacząco zwiększa porównywalność otrzymanywnych wyników, a także jest zgodne z zasadą 3R. Zaproponowana metoda hodowli komórek glejowych pozwala badać zarówno procesy fizjologiczne, jak i patologiczne, z uwzględnieniem interakcji między poszczególnymi typami komórek oraz zmniejszyć liczbę zwierząt wykorzystywanych do pobrania komórek. Badanie biologii poszczególnych frakcji komórkowych hodowanych jako monofrakcje, jak również wspomnianych interakcji międzykomórkowych pozwala badać zarówno procesy neurorozwojowe, jak i mechanizmy uruchamiane w modelowanych stanach patofizjologicznych. Prawidłowa komunikacja międzykomórkowa pozwala na zachowanie homeostazy w mikrośrodowisku tkankowym, jest niezbędna w prawidłowym rozwoju OUN, zapewnia uruchomienie odpowiedzi komórkowej w stanach patofizjologicznych i promuje procesy neuronaprawcze [106–112].

Wykorzystywana w niniejszej pracy metoda hodowli pozwala porównać wpływ niedoboru tlenu i substancji troficznych na przeżywalność, morfologię, proliferację i różnicowanie poszczególnych typów komórek glejowych oraz ich współhodowli. Porównanie badanych procesów w hodowlach poszczególnych frakcji glejowych z ich współhodowlami pozwala ocenić wpływ oddziaływań międzykomórkowych na ich przebieg. Ponadto, opracowany model trzech typów hodowli glejowych pozyskiwanych z mózgow szczerów neonatalnych może znaleźć zastosowanie np. w badaniach przedklinicznych w testowaniu

nowych potencjalnych terapii farmakologicznych nie tylko w modelu asfiksji okołoporodowej *in vitro*. Modelowanie opracowanej metody np. poprzez obniżenie stężenia glukozy w pożywce hodowlanej albo zastosowanie LPS lub TNF $\alpha$  pozwala na odzwierciedlenie wybranych stanów patologicznych takich jak wywołanie przejściowej/chronicznej hipoglikemii lub indukcję stanu zapalnego w warunkach *in vitro* [113–116].

W badaniach przeprowadzonych na modelach zwierzęcych pokazano, że w wyniku HI dochodzi głównie do uszkodzenia neuronów i oligodendrocytów, co kompensowane jest wzmożoną oligogliogenezą [117,118]. Podobnie, wyniki przeprowadzonych badań pokazują, że procedura OGD, która pozwala odzwierciedlać warunki hipoksyjno-ischemiczne *in vitro*, stymuluje OPCs do proliferacji, chociaż zastosowanie warunków hodowli bez suplementacji surowicą znacząco obniża tempo namnażania komórek.

Nowopowstałe OPCs przechodzą następnie wieloetapowy proces różnicowania w dojrzałe oligodendrocyty, zdolne do wytwarzania osłonki mielinowej [23]. Progenitory oligodendrocytów są jednak niezwykle wrażliwe na zmiany homeostazy mikrośrodowiskowej, które mogą wpływać na ich przeżycie, proliferację czy różnicowanie, a tym samym na przebieg procesu mielinizacji OUN [23]. Co ważne, pomimo okresowego niedoboru tlenu i glukozy, część komórek jest zdolna do różnicowania, co potwierdziliśmy dzięki przeprowadzonym analizom immunocytochemicznym za pomocą specyficznych markerów (np. CNPaza czy GalC). Wykazaliśmy jednak, że proces dojrzewania komórek, którego etapem końcowym jest nabycie zdolności do syntezy składników mieliny, na skutek OGD jest spowolniony.

Dotychczasowe badania wykazały, że OPCs są komórkami zdolnymi do migracji, także na skutek chemotaksji, a także wydzielają czynniki modulujące odpowiedź immunologiczną [23,56]. Istotnym czynnikiem, zwiększającym przeżycie i różnicowanie OPCs w warunkach *in vitro*, jest dodatek suplementu ITS, w skład którego wchodzi insulina, transferyna oraz selenian sodu. Są to czynniki biorące udział w regulacji fizjologicznej biologii oligodendrocytów, w tym aktywacji genów związanych z procesem mielinogenezy [119,120]. Niektóre badania wskazują, że dojrzewanie OPCs *in vitro* jest przywrócone, jeśli komórki te hodowane są w pożywkach kondycjonowanych przez astrocyty, nawet w warunkach hipoksji [17]. W niniejszych badaniach potwierdziliśmy tę tezę obserwując obecność różnicujących komórek GalC<sup>+</sup> we współhodowlach OPCs z astrocytami.

## Wpływ wybranych związków biomimetycznych na komórki glejowe

W przypadku hodowli *in vitro* ważnym czynnikiem wpływającym na procesy biologiczne komórek, oprócz składu pożywki i obecności suplementów, jest również podłoże hodowlane. Badanie różnych związków biomimetycznych ma na celu uzyskanie warunków hodowli zbliżonych do warunków fizjologicznych. We wstępnych badaniach przeprowadzonych z wykorzystaniem astrocytów zaobserwowaliśmy, że nie przeżywają one na podłożu zawierającym ornitynę. Zastosowanie innych związków, będących składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej, takich jak FBR, LAM, ECM Gel i porównanie ich do standardowo stosowanej PLL, pozwoliło zbadać ich wpływ na liczebność, morfologię oraz ekspresję wybranych markerów astrocytarnych.

Uzyskane wyniki badań znajdują potwierdzenie w analizach przeprowadzonych przez inne zespoły: fibronektyna odgrywa ważną rolę zarówno w adhezji komórek do podłoża, jak i w widoczny sposób wpływa na ich morfologię [121]. Dodatkowo zaobserwowaliśmy, że rodzaj podłoża wpływa też na liczebność komórek. Największe zagęszczenie astrocytów obserwowaliśmy na płytkach pokrytych FBR, jednakże komórki wysiane na tym podłożu miały zmienioną morfologię, charakteryzującą się fibroblastycznym kształtem, zasadniczo obiegającym od powszechnie prezentowanej morfologii tych komórek. Klasycznie bowiem, astrocyty zasiedlające istotę białą przedstawiane są jako gwiaździste, zróżnicowane komórki ze zwartą cytoplazmą i ekspresją GFAP [28,122].

Natomiast podczas hodowli na podłożu ECM Gel komórki tworzyły skupiska, co w znaczący sposób ograniczyło możliwość badania ich morfologii. Pokrycie podłoża hodowlanego LAM nie wpływało na ich morfologię, skutkowało jednak najmniejszą liczbą komórek w hodowli. Może to być związane z wykazanim zaangażowaniem lamininy w migrację astrocytów, co wyklucza silną adhezję do wymienionego substratu [123].

W związku z powyższymi obserwacjami, stosowanie PLL wydaje się być dobrym wyborem, ponieważ związek ten nie wpływa negatywnie na liczbę komórek oraz nie zmienia ich morfologii, a jego właściwości adhezyjne są wystarczające do prowadzenia hodowli adherentnej astrocytów [124].

Co warte odnotowania, omawiane właściwości adhezyjne wywierają istotny wpływ na ekspresję wybranych, specyficznych markerów astrocytarnych, takich jak GFAP, GS czy EAAT1.

W wyniku uszkodzenia mózgu dochodzi do zwiększonej ekspresji GFAP - białka będącego klasycznym markerem astrocytów, które odgrywa ważną rolę w ukształtowaniu struktury i morfologii komórek oraz w procesach regeneracji i glejozy [28,125–127]. Wyniki niektórych badań wykazują, że istnieje korelacja między stężeniem GFAP w surowicy a stopniem dotkliwości HI oraz stężeniem GFAP w płynie mózgowo-rdzeniowym a śmiercią noworodków [125,128]. Co ciekawe, podwyższony poziom GFAP występuje również po zastosowaniu hipotermii terapeutycznej i jest powiązany z nieprawidłowymi reakcjami neurologicznymi u dwulatków [129]. GFAP jest markerem charakterystycznym dla dojrzałych astrocytów i najwyższą jego ekspresję obserwuje się głównie w dojrzałym mózgu, choć wielu badaczy wskazuje na jego obecność również w mózgach płodów [28]. W eksperymentach *in vivo* stwierdzono zwiększoną gęstość komórek GFAP<sup>+</sup> 8 dni po HI w modelu neonatalnej asfiksji, podobne wyniki uzyskano w modelu, w którym uszkodzenie hipoksyjno-ischemiczne indukowano u 6-tygodniowych szczurów [130,131]. Natomiast w modelu *in vivo* imitującym łagodną HI nie zaobserwowano różnic w ekspresji GFAP między grupą kontrolną a grupą po HI [132]. Kolejne badania, przeprowadzone na myszach neonatalnych wskazują na zwiększoną ekspresję mRNA GFAP po HI w korze mózgu [133]. Co ciekawe, po OGD dochodziło do zwiększonej śmierci astrocytów pozyskanych od myszy z wyciszonym genem *gfap* [134].

W przeprowadzonych przez nas badaniach *in vitro* sprawdzano wpływ różnych związków na ekspresję GFAP w astrocytach w warunkach kontrolnych i po OGD. Zaobserwowaliśmy znaczący wzrost ekspresji GFAP w komórkach hodowanych z wykorzystaniem FBR w porównaniu do pozostałych związków. Ponadto, to właśnie w komórkach wysianych na podłoże z dodatkiem FBR zaobserwowaliśmy największe, choć nieistotne statystycznie, różnice między wariantem kontrolnym a wariantem poddanym procedurze OGD.

Kolejnym uznanym markerem astrocytów jest EAAT1, transporter glutaminianu [135–138]. Transportery glutaminianu stanowią barierę ochronną przed ekscytotoksycznością poprzez resorpcję nadmiaru glutaminianu z przestrzeni synaptycznej do komórek glejowych [139]. Wyniki przeprowadzonych badań *in vitro* wskazują na znaczący wzrost EAAT1 w wariantcie poddanym procedurze OGD w przypadku komórek hodowanych na podłożach PLL, LAM i FBR. Natomiast na podłożu z dodatkiem ECM Gel zaobserwowaliśmy odwrotny efekt. Podobnie jak w przypadku GFAP, największe różnice między wariantami zaobserwowaliśmy w komórkach hodowanych na podłożu z dodatkiem FBR. Niektóre

badania również wskazują na wzrost ekspresji EAAT1 w przypadku HI [140]. Z kolei Dallas i współpracownicy [141] wykazali spadek poziomu mRNA EAAT1 po HI, jednakże astrocyty w opisywanych badaniach hodowane były z dodatkiem płodowej surowicy cielęcej mogącej wykazywać działanie modulujące przebieg badanych procesów.

Syntetaza glutaminy (GS), służąca także jako znacznik astrocytów, odpowiedzialna jest za detoksykację glutaminianu [142]. W przeprowadzonych badaniach nie wykazaliśmy różnic w ekspresji tego markera w wariacie kontrolnym w stosunku do wariantu poddanego procedurze OGD, jednakże zaobserwowaliśmy, że ekspresja GS jest najwyższa w przypadku komórek hodowanych na podłożu zawierającym FBR. Niektóre badania donoszą, że ischemia u szczurów wywołuje wzrost ekspresji GS, co koreluje z wynikami uzyskanymi z tkanek ludzkich [142,143].

Składniki ECM tworzą swoiste rusztowanie międzykomórkowe do migracji komórek progenitorowych, a także poprzez ustrukturyzowanie przestrzeni międzykomórkowej mają wpływ na wydłużanie i rozgałęzianie się wypustek komórkowych, mają udział w kształtowaniu OUN podczas jego rozwoju, w tym również w formowaniu synaps [144–147]. Uzyskane przez nas wyniki wykazały, że OPCs hodowane na podłożu zawierającym ECM Gel nie przeżywały powyżej 24 godzin. Dodatkowo, nie zaobserwowaliśmy żadnego wpływu pozostałych badanych związków biomimetycznych na przeżycie czy morfologię OPCs w ciągu pierwszych 24 godzin hodowli, kiedy komórki zaczynają intensywnie różnicować się.

Laminina jest związkiem mającym wpływ nie tylko na przeżycie, ale też na proliferację, różnicowanie, zdolności migracyjne i mielinizację oligodendrocytów w warunkach *in vitro* [123,148]. Niektóre badania wskazują na wpływ lamininy, ale nie fibronektyny, na przeżycie oligodendrocytów, jednakże w obecności PDGF [123]. Ponadto, największy wpływ lamininy odnotowuje się w stosunku do zdolności migracyjnych OPCs, które nie były przedmiotem niniejszych badań. Mianowicie, OPCs hodowane na lamininie są bardziej ruchliwe niż te wysiane na PLL [123]. Ponadto, OPCs hodowane na lamininie charakteryzują się bardziej skomplikowaną morfologią i dłuższymi wypustkami w warunkach *in vitro* [123]. Również OPCs wysiane na lamininie odznaczają się lepszym formowaniem mieliny niż hodowane na FBR [123]. Badania wskazują również na istotny wpływ zastosowanej izoforny oraz stężenia lamininy na morfologię OPCs [123,148,149]. Dodatkowo, na wspomniane wyżej zdolności migracyjne, zmiany morfologii czy ekspresji markerów może wpływać dodatek do hodowli komórkowej surowicy cielęcej, suplementów (takich jak PDGF-AA, czynnik wzrostu fibroblastów 2 (FGF2)) czy pożywki zawierającej

składniki promujące różnicowanie [149–152]. W związku z powyższym, różnice w otrzymanych wynikach dotyczących OPCs mogą być spowodowane zastosowaniem innej izoformy lamininy, odmiennego stężenia tego związku oraz specyficznymi, restrykcyjnymi warunkami prowadzonej hodowli (brak surowicy w pożywce hodowlanej) oraz krótkim czasem, w którym przeprowadzane były obserwacje.

Zaobserwowany przez nas brak wpływu FBR na hodowlę OPCs *in vitro* jest zgodny z wynikami innych grup badawczych sugerujących, że FBR nie wpływa na przeżycie różnicujących się OPCs. Jednakże, wyniki uzyskane przez inne grupy badawcze wskazują na pozytywny wpływ fibronektyny na przeżycie, proliferację i zdolności migracyjne OPCs [148,149,153].

Analizy przeprowadzone z wykorzystaniem dwóch różnych frakcji komórkowych oraz czterech różnych związków biomimetycznych pokazują, że w zależności od rodzaju badanych komórek i użytych związków, wywierają one zróżnicowany wpływ nie tylko na przeżycie komórek i ich morfologię, ale także prowadzą do zmian ekspresji kluczowych markerów komórkowych. Co równie ważne, ekspresja niektórych czynników w mózgu jest zmienna i zależy od badanego regionu mózgu, co również przekłada się na interpretację otrzymywanych wyników. Należy także wziąć pod uwagę, że astrocyty stanowią heterogenną populację komórek i ich podtypy, pod względem molekularnym, mogą znacząco różnić w zależności od regionu mózgu [154].

Podsumowując, przeprowadzone badania są oryginalne pod względem badania wpływu wybranych związków biomimetycznych na ekspresję wybranych markerów astrocytarnych. Co ważne, w zastosowanym modelu dobrano optymalne warunki sprzyjające utrzymaniu komórek w warunkach normoksji fizjologicznej i odwzorowaniu procesów komórkowych zachodzących *in vivo*.

## **Hodowla neonatalnego mikrogleju i astrocytów**

W celu porównania wpływu OGD na różne typy komórek glejowych, podjęto się opracowania metody hodowli w warunkach normoksji fizjologicznej i w pożywce bezsurowiczej astrocytów oraz mikrogleju. Dotąd w literaturze brak jest doniesień o badaniach *in vitro* na wymienionych typach komórek glejowych z zastosowaniem powyższych kryteriów. Shu et al. wykazali, że procedura OGD może prowadzić do aktywacji mikrogleju wyrażonej poprzez zmiany morfologii komórek oraz ich profilu sekrecyjnego, w



szczegółności zwiększonego wydzielania IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  czy IL6 [155]. Jednakże w eksperymencie, którego wyniki przedstawiono powyżej, komórki hodowano w pożywce z dodatkiem DMEM/F12 i 10% surowicy cielęcej i dopiero w momencie poddawania komórek procedurze OGD wycofano surowicę z pożywki. Co równie istotne, komórki izolowano poprzez całonocne wytrząsanie i hodowano w warunkach tlenu atmosferycznego. Niektórzy badacze wskazują, że hodowanie mikrogleju w pożywkach z dodatkiem surowicy może zmieniać ekspresję genów [156]. Wyniki przeprowadzonych badań, będących tematem niniejszej rozprawy doktorskiej, pokazują, że sama procedura OGD nie wpływa negatywnie na przeżywalność komórek mikrogleju. Jeśli po izolacji komórek z hodowli mieszanej surowica zostaje wycofana, przeżycie komórek wzrasta. Tak przeprowadzony eksperyment zapewnia kontrolowane warunki wzrostu komórek i umożliwia badanie ich sekretomu. Wyniki otrzymane z przeprowadzonych badań, potwierdzone oceną morfologii komórek mającą na celu określenie liczby komórek cechujących się fenotypem ameboidalnym, wskazują, że procedura OGD nie prowadzi do zmiany morfologii tych komórek, co znajduje potwierdzenie w badaniach immunocytochemicznych z wykorzystaniem markerów fenotypu spoczynkowego (np. IBA1 czy OX42), ale prowadzi do zwiększonej proliferacji komórek [157].

Dodatkowo, kolejnym ważnym aspektem, który należy brać pod uwagę jest pochodzenie komórek. W badaniach najczęściej znajdują zastosowanie linie komórkowe, które mimo wielu zalet, mają liczne ograniczenia, takie jak niestabilność genetyczna, nieograniczone podziały komórkowe, zaburzona zdolność do różnicowania i dojrzewania czy większa różnorodność typów morfologicznych [158–161]. Co istotne, właściwości komórek pochodzących z linii komórkowej mogą ulegać zmianom w ciągu kolejnych pasażów [158]. W związku z tym, pojawiają się trudności w porównywalności i interpretacji wyników otrzymywanych przez różne zespoły.

Inną badaną frakcją glejową, wykazującą dużą reaktywność w warunkach hipoksji-ischemii są astrocyty. Jak wykazano, aktywacja astrocytów prowadzi do nadekspresji szeregu cytokin o charakterze prozapalnym, co skutkuje rozwojem stanu zapalnego i prowadzi do uszkodzenia i śmierci neuronów [162,163]. Dodatkowo astrocyty są głównym źródłem glutaminianu i mediatorami obrzęku cytotoksycznego [164]. Wiadomo jednak, że astrocyty mogą mieć także korzystny wpływ na komórki nerwowe, m.in. poprzez uwalnianie gliotransmiterów i w konsekwencji modulację aktywności synaps czy poprzez wzmocnienie

wychwytu glutaminianu, a także wydzielanie czynników troficznych (np. NGF, FGF) [27,163,165]

Mimo dosyć dużej odporności astrocytów na niesprzyjające warunki, podczas optymalizacji metody hodowli *in vitro* tych komórek, zaobserwowaliśmy istotny wpływ gęstości hodowli na ich przeżywalność, czego nie odnotowaliśmy w pozostałych badanych frakcjach komórek glejowych. Wydaje się, że najbardziej istotną rolę w przeżyciu astrocytów stanowią ich wzajemne oddziaływania parakryne i kontakt bezpośredni, co tłumaczyłoby wpływ gęstości wysiania na przeżywalność komórek. Jak odnotowaliśmy w przeprowadzonych eksperymentach, jeśli astrocyty nie utworzą stabilnych sieci, obumierają. Dodatek surowicy zwiększa zdolność astrocytów do sieciowania się, jednakże jej brak nie wpływa negatywnie na ich przeżywalność. Najnowsze badania pokazują również, że brak surowicy w hodowli *in vitro* prowadzi do zmiany morfologii tych komórek - przybierają fenotyp bardziej zbliżony do astrocytów *in vivo* [124]. Dodatkowa suplementacja wspomnianym wcześniej odczynnikiem ITS nie wpływa ani na przeżywalność, ani na morfologię astrocytów i nie może stanowić substytutu dla surowicy, co potwierdzono również w badaniach innych grup [124]. Natomiast dodatek odczynnika Serum Replacement o zdefiniowanym składzie do pożywki hodowlanej prowadzi do śmierci komórek. Ponadto należy wziąć pod uwagę, że astrocyty, podobnie jak OPCs, cechują się dużym zapotrzebowaniem energetycznym i troficznym, aby móc pełnić swoje funkcje w OUN. W przypadku nadmiernej gęstości komórek dochodzi do szybszego zużycia składników odżywczych, zakwaszenia pożywki hodowlanej i w efekcie do śmierci komórek. Przeprowadzone badania posłużyły zatem do wyboru zarówno optymalnej gęstości hodowli poszczególnych frakcji glejowych, jak i podłoża hodowlanego, zapewniającego odpowiednią adhezję i różnicowanie wszystkim trzem typom komórek glejowych, ze względu na planowane współhodowle.

## **Analiza sekretomu oraz ekspresji czynników w komórkach glejowych**

Opracowana i powyżej opisana metoda hodowli poszczególnych typów komórek glejowych została przez nas zastosowana do badania wybranych wzajemnych interakcji komórkowych w kontekście wpływu na ich aktywność sekrecyjną, zarówno w warunkach normalnych, jak i po wystąpieniu okresowego niedoboru tlenu i glukozy. Jak zostało udowodnione przez inne grupy badawcze, zarówno astrocyty, jak i mikroglej odgrywają istotną rolę w różnicowaniu neonatalnych progenitorów oligodendrocytarnych, jak i w samym

procesie mielinogenezy [35,45]. Mając na uwadze, że zwłaszcza w wyniku następstw asfiksji okołoporodowej dochodzi do zaburzeń dojrzewania oligodendrocytów, a w konsekwencji do nieprawidłowej mielinizacji i malformacji w istocie białej mózgu [117,166,167], pojawia się pytanie, jaką rolę w tym procesie odgrywają inne typy komórek glejowych. Postanowiliśmy zatem zbadać, jak asfiksja okołoporodowa, modelowana *in vitro* przez czasową niedostępność glukozy i tlenu, wpływa na wydzielanie wybranych cząsteczek sygnałowych przez komórki glejowe. Dodatkowe zagadnienie badawcze dotyczyło potencjalnej modulacji poziomu sekrecji poprzez oddziaływania międzykomórkowe po OGD, a także w przypadku, gdy tylko jedna frakcja komórkowa poddana była procedurze naśladującej procesy patofizjologiczne. Wyniki uzyskane ze współhodowli komórek z frakcją kontrolną mogą dostarczyć istotnych informacji w kontekście przyszłych potencjalnych terapii komórkowych opartych na przeszczepach komórek glejowych, np. wyprowadzonych z komórek macierzystych pochodzących z tkanek okołoporodowych, takich jak krew pępowinowa czy też galareta Whartona sznura pępowinowego.

Zgodnie z powyższymi założeniami, przy zastosowaniu ultraczułych metod biochemicznych zmierzono poziom wybranych czynników wydzielanych przez poszczególne typy komórek glejowych zarówno hodowanych jako oddzielne populacje komórkowe, jak i w ich współhodowlach. Z naszych badań wynika, że monofrakcje poszczególnych typów komórek glejowych cechują się odmiennym profilem sekrecyjnym. Współhodowanie komórek glejowych w przypadku kilku spośród analizowanych czynników wpływa natomiast modulująco na ich zdolności wydzielnicze.

Jednym z kluczowych czynników zaangażowanych w proces mielinogenezy jest IGF-1. Jest to peptyd odgrywający kluczową rolę w proliferacji i przeżyciu komórek, stymulując różnicowanie OPCs oraz hamując apoptozę dojrzałych oligodendrocytów [119,168]. Jedną z funkcji IGF-1 jest inicjowanie i koordynowanie etapów procesu mielinogenezy oraz remielinizacji, zapewniając tym samym prawidłowy rozwój i funkcjonowanie OUN [119]. Ze względu na szeroki wachlarz funkcji jaki pełni IGF-1, zarówno endokryne i parakryne wydzielanie przyczynia się do prawidłowego funkcjonowania OUN [169]. Poziom IGF-1 wydzielanego do pożywki hodowlanej znacząco różni się w zależności od badanej frakcji komórek glejowych. Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że w wyniku niedoboru tlenu i glukozy astrocyty zwiększają sekrecję IGF-1, natomiast w przypadku OPCs i mikrogleju wydzielanie tego czynnika troficznego jest zmniejszone. Autokryne wydzielanie IGF-1 przez komórki glejowe ma istotny wpływ w szczególności na prawidłową proliferację

czy dojrzewanie OPCs. Zarówno w pierwszym, jak i w trzecim dniu hodowli zaobserwowaliśmy znacznie wyższy poziom IGF-1 w pożywkach, w których hodowano astrocyty, niż w pożywkach, w których hodowane były OPCs czy mikroglej. OGD, naśladujące warunki towarzyszące HI wpływa stymulująco na wydzielanie tego czynnika przez astrocyty, co może przyczynić się do wzmożonej proliferacji OPCs przy jednoczesnym zahamowaniu ich różnicowania i stanowić podłoże zaobserwowanych zaburzeń istoty białej po neonatalnej HI [167,170]. Wyniki innych grup badawczych wskazują, że w pożywce hodowlanej kondycjonowanej przez mikroglej, poziom IGF-1 jest ponad 6-krotnie wyższy niż w pożywce kondycjonowanej przez astrocyty [17,20,171]. Różnice w uzyskanych wynikach spowodowane są prawdopodobnie stosowaniem odmiennych protokołów hodowli, w tym podwyższonego stężenia tlenu w stosunku do tego panującego w tkance nerwowej, a także stosowaniem do hodowli surowicy zwierzęcej, mającej udowodnione działanie stymulujące i protekcyjne.

Kolejnym czynnikiem mogącym pełnić kluczową rolę w zapobieganiu skutkom przebytego urazu HI jest BDNF, którego poziom w krwi pępowinowej skorelowany jest z dotkliwością HI i stopniem zaburzeń neurologicznych [172,173]. Forma dojrzała BDNF jest czynnikiem zaangażowanym w przeżycie, wzrost, migrację i adhezję neuronów w OUN, wspierającym oligodendrogenezę i różnicowanie OPCs oraz regenerację istoty białej po uszkodzeniach, a produkowana jest przez reaktywne astrocyty, OPCs, oligodendrocyty i mikroglej [15,17,19,23,174–176]. Ponadto, astrocyty odpowiedzialne są za magazynowanie BDNF i poprzez to mają wpływ na regulację jego poziomu w mózgu, uwalniając ten czynnik troficzny w miarę potrzeb [177,178]. Otrzymane przez nas wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają ekspresję BDNF we wszystkich typach komórek glejowych i wskazują jednocześnie, że wewnątrzkomórkowe stężenie BDNF mierzone po 24 godzinach od urazu jest niższe we współhodowlach niż w poszczególnych monofrakcjach komórek glejowych. Największą różnicę zaobserwowaliśmy we współhodowli astrocytów z OPCs, gdzie poziom ekspresji odnotowano na bardzo niskim poziomie w porównaniu do OPCs czy astrocytów wysianych jako monofrakcje, co wskazuje na regulację poziomu ekspresji poprzez oddziaływanie międzykomórkowe. Nie zaobserwowaliśmy natomiast statystycznie znamiennych różnic między wariantem kontrolnym a tym poddanym procedurze OGD co wskazuje, że w badanym punkcie czasowym i przy zastosowanym okresie trwania procedury, czasowa niedostępność glukozy i tlenu nie wywiera istotnego wpływu na wewnątrzkomórkową ekspresję BDNF w komórkach glejowych. Ponadto nie wykazaliśmy

obecności BDNF w pożywkach w badanym punkcie czasowym, co może być spowodowane zbyt niskim poziomem tego czynnika wydzielanym przez komórki. Przyczyna niewykrywalności BDNF w pożywkach hodowlanych może być także związana z jego małą stabilnością i relatywnie krótkim okresem półtrwania, który u ludzi we krwi wynosi od 1 do 10 minut, a w płynie mózgowo rdzeniowym około 1 godziny, natomiast w osoczu szczura około jednej minuty [112,179–184]. Pomimo dosyć dobrze opisanym właściwościom BDNF, jak dotychczas niewiele jest badań skoncentrowanych wokół wpływu HI na ekspresję tego czynnika [175].

Niektóre badania wskazują, że BDNF wydzielany przez astrocyty w ich współhodowli z OPCs w warunkach *in vitro*, prowadzonej przez 7 dni, promuje oligodendrogenezę [185,186]. W badaniach na szczurzym neonatalnym modelu *in vivo* innych grup potwierdzono wyższy poziom ekspresji mRNA BDNF w korze mózgu i hipokampie w grupie po HI, już 6h po uszkodzeniu [175,187]. Wyniki przedstawionych badań wskazują, że BDNF jest jednym z głównych czynników troficznych wspierających prawidłowe funkcjonowanie oligodendrocytów. Jego podwyższony poziom po HI może mieć korzystny wpływ na mikrośrodowisko komórkowe, modulując zachodzące *in situ* procesy i sprzyjając uruchomieniu mechanizmów neuronaprawczych.

Ze względu na rozwój stanu zapalnego po wystąpieniu okołoporodowej HI dalsza część badań skupiona została na analizie wybranych chemokin i ich receptorów pełniących wiodącą rolę w odpowiedzi immunologicznej [172,188,189]. W tym kontekście zmierzono poziom ekspresji chemokiny CXCL1 i jej głównego receptora CXCR2. Ścieżka sygnałowa CXCL1/CXCR2 odgrywa ważną rolę w rekrutacji neutrofilii do miejsc ze stanem zapalnym i nasila procesy zapalne, w związku z czym może prowadzić do uszkodzenia tkanki w mózgu [190,191]. Ponadto, ścieżka ta zaangażowana jest w aktywację mikrogleju o profilu prozapalnym [192]. Wyniki uzyskane przez kilka grup badawczych potwierdzają, że wszystkie komórki glejowe wykazują ekspresję CXCR2 i CXCL1, a w przypadku OPCs sygnalizacja ta ma swój udział w regulowaniu proliferacji i migracji tych komórek [193–196]. Ekspresja receptora CXCR2 cechuje przede wszystkim komórki o charakterze progenitorowym, co ma związek z jego udziałem w regulacji wyżej wspomnianych procesów proliferacji i migracji, lecz jego obecność potwierdzono także w dojrzałych, mielinizujących oligodendrocytach [71,197–200]. Wyniki uzyskane przez inne grupy badawcze dowodzą, że w warunkach *in vitro* związanie liganda CXCL1 z CXCR2 prowadzi do zahamowania migracji szczurzych, korowych neonatalnych OPCs poprzez inhibicję wydzielania czynnika

PDGF [17,20,61,70,71,197,201]. U myszy neonatalnych z wyłączonym genem *cxcr2* zaobserwowano zmniejszoną liczbę oligodendrocytów, spowodowaną obniżoną proliferacją progenitorów w istocie białej mózgu [201,202]. Astrocyty oraz mikroglej aktywowany w odpowiedzi na wybrane stany patologiczne OUN również charakteryzują się ekspresją tego receptora [202,203]. Jak potwierdzono w przeprowadzonych przez nas badaniach *in vitro*, ekspresja receptora cechuje wszystkie badane frakcje glejowe, ale jest znacząco niższa we współhodowlach, w porównaniu do poszczególnych monofrakcji. Wydaje się, że obecność astrocytów lub mikrogleju we współhodowlach ma inhibicyjny wpływ na ekspresję CXCR2. Ponadto, wykazaliśmy, że procedura OGD nie prowadzi do zwiększenia ekspresji receptora w badanych frakcjach. W nadsączach hodowlanych, w których hodowano OPCs zaobserwowaliśmy podwyższony poziom CXCL1 w wariacie poddanym procedurze OGD. Poziom ten jest znacznie niższy w pożywkach pochodzących ze współhodowli OPCs z mikroglejem, utrzymując się na podobnym poziomie jak w pożywkach, w których hodowano sam mikroglej.

Zaprezentowane wyniki badań dowodzą, że po OGD dochodzi do zmian w ekspresji CXCR2 i w wydzielaniu CXCL1 przez komórki glejowe. Co istotne, odpowiedź komórkowa poprzez oś sygnalizacyjną CXCL1/CXCR2 może być modulowana *in situ* poprzez oddziaływanie między komórkami glejowymi, co wskazuje na ich rolę immunomodulatoryjną w rozwoju stanu zapalnego. Ze względu na nieliczne doniesienia o wpływie HI na omawianą ścieżkę sygnałową, otrzymane wyniki badań stanowią źródło informacji, mogących wskazać kolejne, potencjalne markery HI i cele terapeutyczne w opracowywaniu strategii zapobiegających rozwojowi stanu zapalnego.

Inną ścieżką sygnałową zaangażowaną w odpowiedź komórek glejowych na HI może być oś CXCL12/CXCR4. Jej udział został potwierdzony w regulowaniu procesów migracji, proliferacji i przeżyciu komórek glejowych, szczególnie mikrogleju i OPCs, zarówno podczas procesów neurorozwojowych, jak i w odpowiedzi na wybrane czynniki patofizjologiczne [65,66,197,204]. Nadmierna ekspresja CXCL12 stymuluje ekspresję cytokin prozapalnych i prowadzi do aktywacji CXCR4 w mikrogleju, co pobudza te komórki do uwalniania TNF $\alpha$  i w konsekwencji do aktywacji astrocytów, nadmiernego uwalniania glutaminianu i ekscytotoksyczności [65,66,205]. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują na znaczący wzrost ekspresji CXCL12 w mikrogleju w wariacie poddanym procedurze OGD w porównaniu do OPCs. Co istotne, ekspresja CXCL12 w OPCs była wyższa niż w astrocytach czy we współhodowli astrocytów z OPCs w wariacie kontrolnym. Sygnalizacja CXCL12

odbywa się poprzez receptor CXCR4, którego ekspresja we wszystkich typach komórek glejowych została wykazana przez liczne grupy badaczy [16,61,65,66,206], a także potwierdzona w niniejszych badaniach. Co ciekawe, wraz z postępowaniem różnicowania neonatalnych OPCs spada ekspresja CXCR4 – receptora dla CXCL12, najprawdopodobniej w związku z jego główną rolą w migracji komórek [204,207]. Spadek ekspresji receptora zaobserwowaliśmy również w komórkach poddanych procedurze OGD, jednakże współhodowla OPCs z astrocytami prowadzi do zwiększenia ekspresji CXCR4 w tym wariancie.

Jak wykazały dane uzyskane w innych laboratoriach, w warunkach *in vitro* CXCL12 stymuluje proliferację i chemotaksję komórek glejowych [61,73]. Badania przeprowadzone przez Tian i współpracowników [204] pokazują, że CXCL12 reguluje zarówno proliferację, jak i różnicowanie OPCs. Wyniki niektórych badań wskazują, że suplementacja CXCL12 również w warunkach *in vitro* promuje migrację szczurzych neonatalnych OPCs, jednakże pojawiają się również dane wskazujące, że wspomniana suplementacja ma odwrotny wpływ – hamuje zarówno migrację, jak i różnicowanie OPCs [204,207,208]. Badania *in vitro* mikrogleju linii N9 sugerują natomiast zwiększenie ekspresji CXCR4 odnotowane 4h po hipoksji i co za tym idzie zwiększenie migracji mikrogleju, co może prowadzić do nadmiernej obecności tych komórek w miejscu uszkodzenia i prowadzić do neurozapalenia [65,209]. Również w niniejszych badaniach zaobserwowaliśmy tendencję wzrostową w ekspresji CXCR4 w mikrogleju po OGD.

Natomiast zaobserwowany spadek ekspresji tego receptora w oligodendrocytach po OGD może być związany z inhibicyjnym wpływem okresowego niedoboru glukozy i tlenu na różnicowanie komórek, co sugerują także obserwacje ze znakowań immunocytochemicznych, przeprowadzonych dla potwierdzenia wyników badań biochemicznych po upływie kolejnych 48 godzin. Istotnie, morfologia komórek oceniana 72 godziny po OGD wskazuje na obecność komórek o słabo wykształconych, krótszych i nierozgałęzionych wypustkach, wskazując na mniejszy stopień zaawansowania ich rozwoju. Mając na uwadze udział tego receptora w migracji OPCs, w której biorą udział komórki o charakterze progenitorowym i bipolarnym kształcie, odpowiedź chemotaktyczna powinna się wiązać raczej ze zwiększoną ekspresją receptora. Przypuszczalnie jednak w mikrośrodowisku tkankowym w rekrutacji OPCs do miejsca największego uszkodzenia tkanki mogą brać udział także dodatkowe czynniki, modulując odpowiedź chemotaktyczną ze strony progenitorów oligodendrocytarnych [210,211].

Wśród pozostałych analizowanych cząstek, takich jak czynnik GM-CSF oraz chemokin CXCL10, CCL2 i CCL3 wybranych na podstawie ich postulowanego udziału w podstawowych procesach życiowych oligodendrocytów, takich jak przeżycie, proliferacja czy też różnicowanie [56,212–214], odnotowano zmiany uzależnione od wpływu procedury OGD lub współhodowli, jednak zaobserwowane zmiany nie cechowała znamienność statystyczna. Wybrane związki analizowane były w monofrakcjach oraz współhodowli OPCs i mikrogleju. Mając na uwadze fakt, że wymienione typy komórek mają główny udział w modulowaniu zarówno neurorozwojowej mielinogenezy, jak i rozwój stanu zapalnego, do przeprowadzonych badań wybrano właśnie te dwie wymienione frakcje [17,21,45,47,48]. W przeprowadzonych badaniach potwierdziliśmy obecność GM-CSF, CXCL10, CCL2 i CCL3 w pożywkach, w których hodowano OPCs, mikroglej oraz ich współhodowlę. Brak znamiennych różnic w ich poziomie między wariantem kontrolnym a wariantem poddanym OGD wskazuje, że przypuszczalnie zastosowane warunki hodowli nie były wystarczającym bodźcem do wzmożonej sekrecji wymienionych cytokin lub ich poziom zmienia się w innych punktach czasowych. Co istotne, w przypadku CXCL10 i GM-CSF niewiele jest badań w kontekście HI [215–217]. Również badania dotyczące CCL2 i CCL3 skupiają się głównie wokół mikrogleju i astrocytów lub pomiarów stężeń w całym mózgu. Niewiele z nich dotyczy wpływu tych chemokin na OPCs czy oligodendrocyty po okresowej hipoksji-ischemii. W tym kontekście badania wykazują, że wymienione chemokiny wydzielane są przez oligodendrocyty w warunkach *in vitro*, także po zastosowaniu procedury OGD.

W odpowiedzi komórkowej na uraz lub obecność bodźców patofizjologicznych, oprócz chemokin kluczową rolę odgrywają także interleukiny, które mogą działać pro- lub przeciwzapalnie. W tym kontekście interesujące wydaje się pytanie o wpływ OGD na ekspresję cytokiny IL6, która – jak wykazały liczne badania – może pełnić obie te funkcje. Badania przeprowadzone przez inne grupy wskazują, że IL6 stymuluje aktywację i proliferację mikrogleju oraz reguluje zmianę polaryzacji mikrogleju między fenotypami przeciwzapalnym i prozapalnym [218]. W przypadku ischemii IL6 także pełni dualistyczną rolę – w fazie ostrej jest bowiem mediatorem stanu zapalnego, natomiast w pozostałych fazach, jak również w okresie rozwoju mózgu, pełni rolę neurotroficzną [205,219–222]. IL6 odgrywa także ważną rolę w utrzymaniu homeostazy w OUN poprzez udział w neurogeniezie, astrogeniezie i przez kontrolowanie spójności BBB [223]. W niniejszych badaniach potwierdziliśmy również obecność IL6 w pożywkach, w których hodowano mikroglej, OPCs oraz ich współhodowlach. Co ciekawe, w warunkach kontrolnych zaobserwowaliśmy wyższy



poziom IL6 w pożywce, w której hodowano OPCs niż w pożywce, w której hodowano mikroglej, ale OGD stymuluje mikroglej do zwiększonego wydzielania IL6, natomiast w przypadku OPCs zaobserwowaliśmy odwrotną tendencję. Najniższy poziom IL6 odnotowaliśmy natomiast w pożywce, w której współhodowano OPCs z mikroglejem w wariancie, w którym tylko OPCs były poddane procedurze OGD. Wskazuje to na odmienny wpływ OGD na właściwości immunomodulacyjne poszczególnych typów komórek glejowych.

W stosowanym modelu *in vitro*, potwierdziliśmy również, że zarówno mikroglej jak i OPCs wydzielają IL1 $\beta$  i IL10 do pożywki hodowlanej, jednak nie zaobserwowaliśmy różnic między badanymi wariantami doświadczalnymi. Badania innych grup również potwierdzają, że 24h po OGD nie zwiększyła się sekrecja IL1 $\beta$  przez neonatalny mikroglej [224]. Co istotne, odnotowaliśmy wyższy poziom IL10 w wariantach poddanych procedurze OGD w porównaniu do kontroli. Jest to obiecujący wynik w kontekście przeciwzapalnego oddziaływania tej interleukiny, której podawanie w egzogennej formie jest rozważane jako potencjalny środek terapeutyczny po wystąpieniu asfiksji okołoporodowej [44].

W kontekście odniesień do skutków neonatalnej hipoksji-ischemii u noworodków, także zaprezentowane wyniki z przeprowadzonej pracy doświadczalnej miały na celu jak najlepsze zachowanie właściwości badanych komórek i odwzorowanie *in vitro* środowiska tkanki nerwowej. W celu zwiększenia potencjału translacyjnego uzyskanych wyników, badania prowadzone były na niepasażowanych i niestymulowanych neonatalnych komórkach glejowych w warunkach normoksji fizjologicznej właściwej dla tkanki nerwowej mózgu [3]. W dotychczasowych eksperymentach, badacze z innych ośrodków podejmowali się porównania gatunkowego ekspresji wybranych cytokin w modelu OGD wykonywanym na komórkach neonatalnych. Do badań porównawczych wybrano komórki ludzkie, szczurze oraz pochodzące od myszy [205]. Badania porównawcze prowadzono jednak z wykorzystaniem pożywek hodowlanych wzbogaconych 10% surowicą zwierzęcą, na pasażach komórek 2-4, co znacząco może wpływać na zmianę właściwości komórek. Ponadto hodowle utrzymywano w podwyższonym, tzw. standardowym poziomie tlenu, który znamienne zwiększa tempo różnicowania oraz starzenia komórek, nawet podczas kilkugodzinnej hodowli *in vitro* [3,225].

W niniejszej pracy przeanalizowano szereg wybranych czynników, mających wpływ na komórki glejowe, których poziom różnił się w zależności od warunków, jakim poddano badane komórki (kontrola vs. OGD). Zaproponowany w niniejszej rozprawie doktorskiej model asfiksji neonatalnej *in vitro* jest unikalny, ze względu na stosowanie normoksji

fizjologicznej, typowej dla tkanki nerwowej mózgu, oraz pożywki bezsurowiczej o restrykcyjnym składzie. Ponadto, model ten pozwala uzyskać wszystkie trzy frakcje glejowe z tej samej hodowli komórek. Co istotne, oprócz badania monofrakcji, możliwe jest również badanie współhodowli komórek glejowych, a co za tym idzie interakcji pomiędzy różnymi typami komórek glejowych. Badanie poziomu ekspresji czynników troficznych i cytokin w zastosowanych różnych wariantach eksperymentalnych wskazuje, że w wielu przypadkach komórki wysiane jako monofrakcje odpowiadają w odmienny sposób niż we współhodowlach z innymi typami komórek glejowych, co stanowi cenne źródło informacji z punktu widzenia zarówno badań podstawowych, jak i przedklinicznych, mających na celu testowanie potencjalnych terapii farmakologicznych. Przepuszczalnie interakcje między komórkami glejowymi mają istotny udział w inicjacji endogennych procesów naprawczych i ich przewadze nad rozwojem procesów neurozapalnych w tkance nerwowej uszkodzonej w wyniku HI, na co pośrednio także wskazują wyniki zaprezentowanych badań.

## Podsumowanie i wnioski

W ramach przeprowadzonej pracy badawczej:

- 1) Opracowano model hodowli trzech typów neonatalnych szczurzych komórek glejowych w pożywkach o restrykcyjnym składzie w warunkach normoksji fizjologicznej cechującej tkankę nerwową. Wykazano, że zarówno procedura izolowania, jak i hodowli komórek mikrogleju nie wywołuje aktywacji tych komórek, co umożliwia zastosowanie opisanej metodologii do badania *in vitro* wybranych mechanizmów związanych z odpowiedzią immunologiczną.
- 2) Opracowaną metodę zastosowano do modelowania *in vitro* warunków hipoksyjno-ischemicznych, poprzez zastosowanie czasowej niedostępności tlenu i glukozy. Jak wykazano, zarówno przeżywalność, jak stopień proliferacji badanych typów komórek jest proporcjonalny do nasilenia wymienionych procesów w modelu neonatalnej HI *in vivo*.
- 3) Po potwierdzeniu, że opracowana metoda w znacznym stopniu odpowiada modelowi *in vivo*, zastosowano ją do badania wpływu OGD na profil sekrecyjny komórek glejowych, wraz z analizą wybranych receptorów.
- 4) Aby przybliżyć poznanie mechanizmów współdziałania komórek glejowych po wystąpieniu okresowego braku glukozy i tlenu, poszczególne frakcje glejowe utrzymywane były we współhodowlach, także z zastosowaniem wariantu, w którym tylko jedna z nich poddana była procedurze OGD. Tak opracowane warianty badawcze pozwoliły ocenić potencjalny wpływ oddziaływań międzykomórkowych na modulację wydzielania wybranych czynników troficznych (IGF-1, BDNF) i cytokin zaangażowanych w proliferację i prawidłowe różnicowanie oligodendrocytów oraz regulowanie odpowiedzi immunologicznej ze strony badanych komórek.

Wnioski:

- 1) Opracowany model hodowli trzech typów neonatalnych szczurzych komórek glejowych w warunkach normoksji fizjologicznej typowej dla tkanki nerwowej umożliwia ocenę podstawowych procesów życiowych badanych komórek, a także modelowanie *in vitro* neonatalnej hipoksji-ischemii.
- 2) Przeprowadzone badania na modelu czasowej niedostępności tlenu i glukozy wykazały, że neonatalne komórki glejowe aktywnie odpowiadają na warunki

naśladujące *in vitro* asfiksję okołoporodową poprzez zmianę poziomu sekrecji wybranych czynników troficznych i cytokin, a także ich receptorów.

- 3) Zastosowanie współhodowli poszczególnych typów komórek glejowych wykazało, że oddziaływanie między komórkami glejowymi mają modulujący wpływ na wydzielanie wybranych czynników troficznych (takich jak BDNF), cytokin oraz ich receptorów.
- 4) Uzyskane wyniki wskazują na istotną rolę oddziaływań międzykomórkowych w modulacji poziomu wydzielania wybranych czynników aktywnych, zaangażowanych w regulowanie podstawowych procesów życiowych komórek, a także ich odpowiedzi immunomodulacyjnej. Otrzymane dane mogą także być użyteczne w opracowywaniu nowych strategii terapeutycznych w zapobieganiu następstwom asfiksji okołoporodowej, celowanych w modulację wzajemnych oddziaływań między komórkami glejowymi.

## Bibliografia

1. Quincozes-Santos, A.; Santos, C.L.; de Souza Almeida, R.R.; da Silva, A.; Thomaz, N.K.; Costa, N.L.F.; Weber, F.B.; Schmitz, I.; Medeiros, L.S.; Medeiros, L.; et al. Gliotoxicity and Glioprotection: The Dual Role of Glial Cells. *Mol Neurobiol* **2021**, *58*, 6577–6592, doi:10.1007/s12035-021-02574-9.
2. Virchow, R. *Die Cellularpathologie in Ihrer Begründung Auf Physiologische Und Pathologische Gewebelehre*; 1. Auflage.; Hirschwald: Berlin, 1858;
3. Janowska, J.; Ziemka-Nalecz, M.; Sypecka, J. The Differentiation of Rat Oligodendroglial Cells Is Highly Influenced by the Oxygen Tension: In Vitro Model Mimicking Physiologically Normoxic Conditions. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, 331, doi:10.3390/ijms19020331.
4. Prinz, M.; Masuda, T.; Wheeler, M.A.; Quintana, F.J. Microglia and Central Nervous System-Associated Macrophages-From Origin to Disease Modulation. *Annu Rev Immunol* **2021**, *39*, 251–277, doi:10.1146/annurev-immunol-093019-110159.
5. Cichorek, M.; Kowiański, P.; Lietzau, G.; Lasek, J.; Moryś, J. Neuroglia - Development and Role in Physiological and Pathophysiological Processes. *Folia Morphol (Warsz)* **2021**, *80*, 766–775, doi:10.5603/FM.a2021.0109.
6. Nishiyama, A. Glial Progenitor Cells in Normal and Pathological States. *Keio J Med* **1998**, *47*, 205–208, doi:10.2302/kjm.47.205.
7. Chu, T.; Shields, L.B.E.; Zeng, W.; Zhang, Y.P.; Wang, Y.; Barnes, G.N.; Shields, C.B.; Cai, J. Dynamic Glial Response and Crosstalk in Demyelination-Remyelination and Neurodegeneration Processes. *Neural Regen Res* **2021**, *16*, 1359–1368, doi:10.4103/1673-5374.300975.
8. Hanslik, K.L.; Marino, K.M.; Ulland, T.K. Modulation of Glial Function in Health, Aging, and Neurodegenerative Disease. *Front Cell Neurosci* **2021**, *15*, 718324, doi:10.3389/fncel.2021.718324.
9. Lago-Baldaia, I.; Fernandes, V.M.; Ackerman, S.D. More Than Mortar: Glia as Architects of Nervous System Development and Disease. *Front Cell Dev Biol* **2020**, *8*, 611269, doi:10.3389/fcell.2020.611269.
10. Allen, N.J.; Lyons, D.A. Glia as Architects of Central Nervous System Formation and Function. *Science* **2018**, *362*, 181–185, doi:10.1126/science.aat0473.
11. Savtchouk, I.; Volterra, A. Gliotransmission: Beyond Black-and-White. *J Neurosci* **2018**, *38*, 14–25, doi:10.1523/JNEUROSCI.0017-17.2017.
12. Minogue, A.M.; Barrett, J.P.; Lynch, M.A. LPS-Induced Release of IL-6 from Glia Modulates Production of IL-1 $\beta$  in a JAK2-Dependent Manner. *J Neuroinflammation* **2012**, *9*, 126, doi:10.1186/1742-2094-9-126.
13. Ye, X.; Zhu, M.; Che, X.; Wang, H.; Liang, X.-J.; Wu, C.; Xue, X.; Yang, J. Lipopolysaccharide Induces Neuroinflammation in Microglia by Activating the MTOR Pathway and Downregulating Vps34 to Inhibit Autophagosome Formation. *J Neuroinflammation* **2020**, *17*, 18, doi:10.1186/s12974-019-1644-8.
14. Janowska, J.; Sypecka, J. Therapeutic Strategies for Leukodystrophic Disorders Resulting from Perinatal Asphyxia: Focus on Myelinating Oligodendrocytes. *Mol Neurobiol* **2018**, *55*, 4388–4402, doi:10.1007/s12035-017-0647-7.
15. Matejuk, A.; Vandenbark, A.A.; Offner, H. Cross-Talk of the CNS With Immune Cells and Functions in Health and Disease. *Front Neurol* **2021**, *12*, 672455, doi:10.3389/fneur.2021.672455.
16. Doetsch, F. The Glial Identity of Neural Stem Cells. *Nat Neurosci* **2003**, *6*, 1127–1134, doi:10.1038/nn1144.
17. Traiffort, E.; Kassoussi, A.; Zahaf, A.; Laouarem, Y. Astrocytes and Microglia as Major Players of Myelin Production in Normal and Pathological Conditions. *Front Cell Neurosci* **2020**, *14*, 79, doi:10.3389/fncel.2020.00079.
18. Zhang, Z.; Li, X.; Zhou, H.; Zhou, J. NG2-Glia Crosstalk with Microglia in Health and Disease. *CNS Neurosci Ther* **2022**, *28*, 1663–1674, doi:10.1111/cns.13948.

19. Hernández, I.H.; Villa-González, M.; Martín, G.; Soto, M.; Pérez-Álvarez, M.J. Glial Cells as Therapeutic Approaches in Brain Ischemia-Reperfusion Injury. *Cells* **2021**, *10*, 1639, doi:10.3390/cells10071639.
20. Kalafatakis, I.; Karagogeos, D. Oligodendrocytes and Microglia: Key Players in Myelin Development, Damage and Repair. *Biomolecules* **2021**, *11*, 1058, doi:10.3390/biom11071058.
21. Hughes, A.N.; Appel, B. Microglia Phagocytose Myelin Sheaths to Modify Developmental Myelination. *Nat Neurosci* **2020**, *23*, 1055–1066, doi:10.1038/s41593-020-0654-2.
22. Popovich, P.G.; Jakeman, L.B.; McTigue, D.M. Glial Responses to Injury. In *Encyclopedia of Neuroscience*; Squire, L.R., Ed.; Academic Press: Oxford, 2009; pp. 853–859 ISBN 978-0-08-045046-9.
23. Sypecka, J.; Sarnowska, A. Heterogeneity of Local Tissue Microenvironment Influences Differentiation of Oligodendroglial Progenitors. *Folia Neuropathol* **2013**, *51*, 103–110, doi:10.5114/fn.2013.35952.
24. Moura, D.M.S.; Brennan, E.J.; Brock, R.; Cocas, L.A. Neuron to Oligodendrocyte Precursor Cell Synapses: Protagonists in Oligodendrocyte Development and Myelination, and Targets for Therapeutics. *Front Neurosci* **2021**, *15*, 779125, doi:10.3389/fnins.2021.779125.
25. Vaes, J.E.G.; Brandt, M.J.V.; Wanders, N.; Benders, M.J.N.L.; de Theije, C.G.M.; Gressens, P.; Nijboer, C.H. The Impact of Trophic and Immunomodulatory Factors on Oligodendrocyte Maturation: Potential Treatments for Encephalopathy of Prematurity. *Glia* **2021**, *69*, 1311–1340, doi:10.1002/glia.23939.
26. Min, Y.-J.; Ling, E.-A.; Li, F. Immunomodulatory Mechanism and Potential Therapies for Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Damage. *Front Pharmacol* **2020**, *11*, 580428, doi:10.3389/fphar.2020.580428.
27. Jang, E.; Kim, J.-H.; Lee, S.; Kim, J.-H.; Seo, J.-W.; Jin, M.; Lee, M.-G.; Jang, I.-S.; Lee, W.-H.; Suk, K. Phenotypic Polarization of Activated Astrocytes: The Critical Role of Lipocalin-2 in the Classical Inflammatory Activation of Astrocytes. *J Immunol* **2013**, *191*, 5204–5219, doi:10.4049/jimmunol.1301637.
28. Middeldorp, J.; Hol, E.M. GFAP in Health and Disease. *Prog Neurobiol* **2011**, *93*, 421–443, doi:10.1016/j.pneurobio.2011.01.005.
29. Zhou, Y.-D. Glial Regulation of Energy Metabolism. *Adv Exp Med Biol* **2018**, *1090*, 105–121, doi:10.1007/978-981-13-1286-1\_6.
30. Czuba, E.; Steliga, A.; Lietzau, G.; Kowiański, P. Cholesterol as a Modifying Agent of the Neurovascular Unit Structure and Function under Physiological and Pathological Conditions. *Metab Brain Dis* **2017**, *32*, 935–948, doi:10.1007/s11011-017-0015-3.
31. Allen, N.J.; Eroglu, C. Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions. *Neuron* **2017**, *96*, 697–708, doi:10.1016/j.neuron.2017.09.056.
32. Mahmoud, S.; Gharagozloo, M.; Simard, C.; Gris, D. Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. *Cells* **2019**, *8*, 184, doi:10.3390/cells8020184.
33. Lee, H.-G.; Wheeler, M.A.; Quintana, F.J. Function and Therapeutic Value of Astrocytes in Neurological Diseases. *Nat Rev Drug Discov* **2022**, *21*, 339–358, doi:10.1038/s41573-022-00390-x.
34. van Deijk, A.-L.F.; Camargo, N.; Timmerman, J.; Heistek, T.; Brouwers, J.F.; Mogavero, F.; Mansvelder, H.D.; Smit, A.B.; Verheijen, M.H.G. Astrocyte Lipid Metabolism Is Critical for Synapse Development and Function in Vivo. *Glia* **2017**, *65*, 670–682, doi:10.1002/glia.23120.
35. Camargo, N.; Goudriaan, A.; van Deijk, A.-L.F.; Otte, W.M.; Brouwers, J.F.; Lodder, H.; Gutmann, D.H.; Nave, K.-A.; Dijkhuizen, R.M.; Mansvelder, H.D.; et al. Oligodendroglial Myelination Requires Astrocyte-Derived Lipids. *PLoS Biol* **2017**, *15*, e1002605, doi:10.1371/journal.pbio.1002605.
36. Anderson, M.A.; Ao, Y.; Sofroniew, M.V. Heterogeneity of Reactive Astrocytes. *Neurosci Lett* **2014**, *0*, 23–29, doi:10.1016/j.neulet.2013.12.030.

37. Khakh, B.S.; Deneen, B. The Emerging Nature of Astrocyte Diversity. *Annu Rev Neurosci* **2019**, *42*, 187–207, doi:10.1146/annurev-neuro-070918-050443.
38. Verkhratsky, A.; Parpura, V.; Li, B.; Scuderi, C. Astrocytes: The Housekeepers and Guardians of the CNS. *Adv Neurobiol* **2021**, *26*, 21–53, doi:10.1007/978-3-030-77375-5\_2.
39. Lee, S.Y.; Chung, W.-S. The Roles of Astrocytic Phagocytosis in Maintaining Homeostasis of Brains. *J Pharmacol Sci* **2021**, *145*, 223–227, doi:10.1016/j.jphs.2020.12.007.
40. Gabryel, B.; Kasprowska, D.; Kost, A.; Łabuzek, K.; Urbanek, T. [Astrocytes in ischemic stroke - a potential target for neuroprotective strategies]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **2015**, *69*, 384–397, doi:10.5604/17322693.1147866.
41. Shao, R.; Sun, D.; Hu, Y.; Cui, D. White Matter Injury in the Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain and Potential Therapies Targeting Microglia. *J Neurosci Res* **2021**, *99*, 991–1008, doi:10.1002/jnr.24761.
42. Hagemeyer, N.; Hanft, K.-M.; Akriditou, M.-A.; Unger, N.; Park, E.S.; Stanley, E.R.; Staszewski, O.; Dimou, L.; Prinz, M. Microglia Contribute to Normal Myelinogenesis and to Oligodendrocyte Progenitor Maintenance during Adulthood. *Acta Neuropathol* **2017**, *134*, 441–458, doi:10.1007/s00401-017-1747-1.
43. Thion, M.S.; Low, D.; Silvin, A.; Chen, J.; Grisel, P.; Schulte-Schrepping, J.; Blecher, R.; Ulas, T.; Squarzone, P.; Hoeffel, G.; et al. Microbiome Influences Prenatal and Adult Microglia in a Sex-Specific Manner. *Cell* **2018**, *172*, 500–516.e16, doi:10.1016/j.cell.2017.11.042.
44. Lim, S.-H.; Park, E.; You, B.; Jung, Y.; Park, A.-R.; Park, S.G.; Lee, J.-R. Neuronal Synapse Formation Induced by Microglia and Interleukin 10. *PLoS One* **2013**, *8*, e81218, doi:10.1371/journal.pone.0081218.
45. Włodarczyk, A.; Holtman, I.R.; Krueger, M.; Yogev, N.; Bruttger, J.; Khorrooshi, R.; Benmamar-Badel, A.; de Boer-Bergsma, J.J.; Martin, N.A.; Karram, K.; et al. A Novel Microglial Subset Plays a Key Role in Myelinogenesis in Developing Brain. *EMBO J* **2017**, *36*, 3292–3308, doi:10.15252/embj.201696056.
46. Verkhratsky, A.; Butt, A. *Glial Physiology and Pathophysiology*; Wiley: Chichester, UK, 2013; ISBN 978-0-470-97852-8.
47. Hughes, A.N. Glial Cells Promote Myelin Formation and Elimination. *Front Cell Dev Biol* **2021**, *9*, 661486, doi:10.3389/fcell.2021.661486.
48. Santos, E.N.; Fields, R.D. Regulation of Myelination by Microglia. *Sci Adv* **2021**, *7*, eabk1131, doi:10.1126/sciadv.abk1131.
49. Buttgerit, A.; Lelios, I.; Yu, X.; Vrohings, M.; Krakoski, N.R.; Gautier, E.L.; Nishinakamura, R.; Becher, B.; Greter, M. Sall1 Is a Transcriptional Regulator Defining Microglia Identity and Function. *Nat Immunol* **2016**, *17*, 1397–1406, doi:10.1038/ni.3585.
50. Paolicelli, R.C.; Sierra, A.; Stevens, B.; Tremblay, M.-E.; Aguzzi, A.; Ajami, B.; Amit, I.; Audinat, E.; Bechmann, I.; Bennett, M.; et al. Microglia States and Nomenclature: A Field at Its Crossroads. *Neuron* **2022**, *110*, 3458–3483, doi:10.1016/j.neuron.2022.10.020.
51. Li, J.; Shui, X.; Sun, R.; Wan, L.; Zhang, B.; Xiao, B.; Luo, Z. Microglial Phenotypic Transition: Signaling Pathways and Influencing Modulators Involved in Regulation in Central Nervous System Diseases. *Front Cell Neurosci* **2021**, *15*, 736310, doi:10.3389/fncel.2021.736310.
52. Cunningham, C. Microglia and Neurodegeneration: The Role of Systemic Inflammation. *Glia* **2013**, *61*, 71–90, doi:10.1002/glia.22350.
53. Benmamar-Badel, A.; Owens, T.; Włodarczyk, A. Protective Microglial Subset in Development, Aging, and Disease: Lessons From Transcriptomic Studies. *Front Immunol* **2020**, *11*, 430, doi:10.3389/fimmu.2020.00430.
54. Matcovitch-Natan, O.; Winter, D.R.; Giladi, A.; Vargas Aguilar, S.; Spinrad, A.; Sarrazin, S.; Ben-Yehuda, H.; David, E.; Zelada González, F.; Perrin, P.; et al. Microglia Development Follows a Stepwise Program to Regulate Brain Homeostasis. *Science* **2016**, *353*, aad8670, doi:10.1126/science.aad8670.

55. Marinelli, C.; Bertalot, T.; Zusso, M.; Skaper, S.D.; Giusti, P. Systematic Review of Pharmacological Properties of the Oligodendrocyte Lineage. *Front Cell Neurosci* **2016**, *10*, 27, doi:10.3389/fncel.2016.00027.
56. Zeis, T.; Enz, L.; Schaeren-Wiemers, N. The Immunomodulatory Oligodendrocyte. *Brain Res* **2016**, *1641*, 139–148, doi:10.1016/j.brainres.2015.09.021.
57. Linnerbauer, M.; Rothhammer, V. Protective Functions of Reactive Astrocytes Following Central Nervous System Insult. *Front Immunol* **2020**, *11*, 573256, doi:10.3389/fimmu.2020.573256.
58. Giovannoni, F.; Quintana, F.J. The Role of Astrocytes in CNS Inflammation. *Trends Immunol* **2020**, *41*, 805–819, doi:10.1016/j.it.2020.07.007.
59. Akay, L.A.; Effenberger, A.H.; Tsai, L.-H. Cell of All Trades: Oligodendrocyte Precursor Cells in Synaptic, Vascular, and Immune Function. *Genes Dev* **2021**, *35*, 180–198, doi:10.1101/gad.344218.120.
60. Marisa, R.; Reesha R., P.; Michal, B. Cytokines in the CNS. *Handb Exp Pharmacol* **2018**, *248*, 397–431, doi:10.1007/164\_2017\_77.
61. Schmitz, T.; Chew, L.-J. Cytokines and Myelination in the Central Nervous System. *ScientificWorldJournal* **2008**, *8*, 1119–1147, doi:10.1100/tsw.2008.140.
62. Mir, I.N.; Chalak, L.F. Serum Biomarkers to Evaluate the Integrity of the Neurovascular Unit. *Early Hum Dev* **2014**, *90*, 707–711, doi:10.1016/j.earlhumdev.2014.06.010.
63. Goshen, I.; Kreisel, T.; Ounallah-Saad, H.; Renbaum, P.; Zalzstein, Y.; Ben-Hur, T.; Levy-Lahad, E.; Yirmiya, R. A Dual Role for Interleukin-1 in Hippocampal-Dependent Memory Processes. *Psychoneuroendocrinology* **2007**, *32*, 1106–1115, doi:10.1016/j.psyneuen.2007.09.004.
64. Gerber, J.; Böttcher, T.; Hahn, M.; Siemer, A.; Bunkowski, S.; Nau, R. Increased Mortality and Spatial Memory Deficits in TNF-Alpha-Deficient Mice in Ceftriaxone-Treated Experimental Pneumococcal Meningitis. *Neurobiol Dis* **2004**, *16*, 133–138, doi:10.1016/j.nbd.2004.01.013.
65. Hu, X.; Liou, A.K.F.; Leak, R.K.; Xu, M.; An, C.; Suenaga, J.; Shi, Y.; Gao, Y.; Zheng, P.; Chen, J. Neurobiology of Microglial Action in CNS Injuries: Receptor-Mediated Signaling Mechanisms and Functional Roles. *Prog Neurobiol* **2014**, *119–120*, 60–84, doi:10.1016/j.pneurobio.2014.06.002.
66. Li, M.; Ransohoff, R.M. Multiple Roles of Chemokine CXCL12 in the Central Nervous System: A Migration from Immunology to Neurobiology. *Prog Neurobiol* **2008**, *84*, 116–131, doi:10.1016/j.pneurobio.2007.11.003.
67. Guyon, A. CXCL12 Chemokine and Its Receptors as Major Players in the Interactions between Immune and Nervous Systems. *Front Cell Neurosci* **2014**, *8*, 65, doi:10.3389/fncel.2014.00065.
68. Chamera, K.; Trojan, E.; Szuster-Głuszczak, M.; Basta-Kaim, A. The Potential Role of Dysfunctions in Neuron-Microglia Communication in the Pathogenesis of Brain Disorders. *Curr Neuropharmacol* **2020**, *18*, 408–430, doi:10.2174/1570159X17666191113101629.
69. Adler, M.W.; Geller, E.B.; Chen, X.; Rogers, T.J. Viewing Chemokines as a Third Major System of Communication in the Brain. *AAPS J* **2006**, *7*, E865–870, doi:10.1208/aapsj070484.
70. Semple, B.D.; Kossmann, T.; Morganti-Kossmann, M.C. Role of Chemokines in CNS Health and Pathology: A Focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 Networks. *J Cereb Blood Flow Metab* **2010**, *30*, 459–473, doi:10.1038/jcbfm.2009.240.
71. Veenstra, M.; Ransohoff, R.M. Chemokine Receptor CXCR2: Physiology Regulator and Neuroinflammation Controller? *J Neuroimmunol* **2012**, *246*, 1–9, doi:10.1016/j.jneuroim.2012.02.016.
72. Asensio, V.C.; Campbell, I.L. Chemokines and Viral Diseases of the Central Nervous System. *Adv Virus Res* **2001**, *56*, 127–173, doi:10.1016/s0065-3527(01)56006-6.
73. Bajetto, A.; Bonavia, R.; Barbero, S.; Schettini, G. Characterization of Chemokines and Their Receptors in the Central Nervous System: Physiopathological Implications. *J Neurochem* **2002**, *82*, 1311–1329, doi:10.1046/j.1471-4159.2002.01091.x.
74. Miller, R.J.; Rostene, W.; Apartis, E.; Banisadr, G.; Biber, K.; Milligan, E.D.; White, F.A.; Zhang, J. Chemokine Action in the Nervous System. *J Neurosci* **2008**, *28*, 11792–11795, doi:10.1523/JNEUROSCI.3588-08.2008.



75. Guo, H.; Jin, Y.X.; Ishikawa, M.; Huang, Y.M.; van der Meide, P.H.; Link, H.; Xiao, B.G. Regulation of Beta-Chemokine mRNA Expression in Adult Rat Astrocytes by Lipopolysaccharide, Proinflammatory and Immunoregulatory Cytokines. *Scand J Immunol* **1998**, *48*, 502–508, doi:10.1046/j.1365-3083.1998.00422.x.
76. Xia, J.-B.; Mao, C.-Z.; Chen, Z.-Y.; Liu, G.-H.; Wu, H.-Y.; Zhou, D.-C.; Park, K.-S.; Zhao, H.; Kim, S.-K.; Cai, D.-Q.; et al. The CXCL10/CXCR3 Axis Promotes Cardiac Microvascular Endothelial Cell Migration via the P38/FAK Pathway in a Proliferation-Independent Manner. *Exp Mol Pathol* **2016**, *100*, 257–265, doi:10.1016/j.yexmp.2016.01.010.
77. Salvi, V.; Sozio, F.; Sozzani, S.; Del Prete, A. Role of Atypical Chemokine Receptors in Microglial Activation and Polarization. *Front Aging Neurosci* **2017**, *9*, 148, doi:10.3389/fnagi.2017.00148.
78. Ouyang, W.; O'Garra, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: From Basic Science to Clinical Translation. *Immunity* **2019**, *50*, 871–891, doi:10.1016/j.immuni.2019.03.020.
79. Rose-John, S. Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2018**, *10*, a028415, doi:10.1101/cshperspect.a028415.
80. Murakami, M.; Kamimura, D.; Hirano, T. Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines. *Immunity* **2019**, *50*, 812–831, doi:10.1016/j.immuni.2019.03.027.
81. Chan, A.H.; Schroder, K. Inflammasome Signaling and Regulation of Interleukin-1 Family Cytokines. *J Exp Med* **2020**, *217*, e20190314, doi:10.1084/jem.20190314.
82. Gillam-Krakauer, M.; Gowen Jr, C.W. Birth Asphyxia. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2022.
83. Murden, S.; Borbélyová, V.; Laštůvka, Z.; Mysliveček, J.; Otáhal, J.; Riljak, V. Gender Differences Involved in the Pathophysiology of the Perinatal Hypoxic-Ischemic Damage. *Physiol Res* **2019**, *68*, S207–S217, doi:10.33549/physiolres.934356.
84. Frajewicki, A.; Laštůvka, Z.; Borbélyová, V.; Khan, S.; Jandová, K.; Janišová, K.; Otáhal, J.; Mysliveček, J.; Riljak, V. Perinatal Hypoxic-Ischemic Damage: Review of the Current Treatment Possibilities. *Physiol Res* **2020**, *69*, S379–S401, doi:10.33549/physiolres.934595.
85. Danladi, J.; Sabir, H. Perinatal Infection: A Major Contributor to Efficacy of Cooling in Newborns Following Birth Asphyxia. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 707, doi:10.3390/ijms22020707.
86. de Haan, M.; Wyatt, J.S.; Roth, S.; Vargha-Khadem, F.; Gadian, D.; Mishkin, M. Brain and Cognitive-Behavioural Development after Asphyxia at Term Birth. *Dev Sci* **2006**, *9*, 350–358, doi:10.1111/j.1467-7687.2006.00499.x.
87. Debuf, M.J.; Carkeek, K.; Piersigilli, F. A Metabolomic Approach in Search of Neurobiomarkers of Perinatal Asphyxia: A Review of the Current Literature. *Front Pediatr* **2021**, *9*, 674585, doi:10.3389/fped.2021.674585.
88. Popescu, M.R.; Panaitescu, A.M.; Pavel, B.; Zagrean, L.; Peltecu, G.; Zagrean, A.-M. Getting an Early Start in Understanding Perinatal Asphyxia Impact on the Cardiovascular System. *Front Pediatr* **2020**, *8*, 68, doi:10.3389/fped.2020.00068.
89. Lutz, I.C.; Allegaert, K.; de Hoon, J.N.; Marynissen, H. Pharmacokinetics during Therapeutic Hypothermia for Neonatal Hypoxic Ischaemic Encephalopathy: A Literature Review. *BMJ Paediatr Open* **2020**, *4*, e000685, doi:10.1136/bmjpo-2020-000685.
90. Kleuskens, D.G.; Gonçalves Costa, F.; Annink, K.V.; van den Hoogen, A.; Alderliesten, T.; Groenendaal, F.; Benders, M.J.N.; Dudink, J. Pathophysiology of Cerebral Hyperperfusion in Term Neonates With Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Systematic Review for Future Research. *Front Pediatr* **2021**, *9*, 631258, doi:10.3389/fped.2021.631258.
91. Mohsenpour, H.; Pesce, M.; Patrino, A.; Bahrami, A.; Pour, P.M.; Farzaei, M.H. A Review of Plant Extracts and Plant-Derived Natural Compounds in the Prevention/Treatment of Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 833, doi:10.3390/ijms22020833.
92. McDouall, A.; Wassink, G.; Bennet, L.; Gunn, A.J.; Davidson, J.O. Challenges in Developing Therapeutic Strategies for Mild Neonatal Encephalopathy. *Neural Regen Res* **2022**, *17*, 277–282, doi:10.4103/1673-5374.317963.
93. Paprocka, J.; Kijonka, M.; Rzepka, B.; Sokół, M. Melatonin in Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Term and Preterm Babies. *Int J Endocrinol* **2019**, *2019*, 9626715, doi:10.1155/2019/9626715.

94. LaRosa, D.A.; Ellery, S.J.; Walker, D.W.; Dickinson, H. Understanding the Full Spectrum of Organ Injury Following Intrapartum Asphyxia. *Front Pediatr* **2017**, *5*, 16, doi:10.3389/fped.2017.00016.
95. Rakesh, K.; Vishnu Bhat, B.; Adhisivam, B.; Ajith, P. Effect of Therapeutic Hypothermia on Myocardial Dysfunction in Term Neonates with Perinatal Asphyxia - a Randomized Controlled Trial. *J Matern Fetal Neonatal Med* **2018**, *31*, 2418–2423, doi:10.1080/14767058.2017.1344633.
96. Barberi, I.; Calabrò, M.P.; Cordaro, S.; Gitto, E.; Sottile, A.; Prudente, D.; Bertuccio, G.; Consolo, S. Myocardial Ischaemia in Neonates with Perinatal Asphyxia. Electrocardiographic, Echocardiographic and Enzymatic Correlations. *Eur J Pediatr* **1999**, *158*, 742–747, doi:10.1007/s004310051192.
97. Martín-Ancel, A.; García-Alix, A.; Gayá, F.; Cabañas, F.; Burgueros, M.; Quero, J. Multiple Organ Involvement in Perinatal Asphyxia. *J Pediatr* **1995**, *127*, 786–793, doi:10.1016/s0022-3476(95)70174-5.
98. Tapia-Rombo, C.A.; Carpio-Hernández, J.C.; Salazar-Acuña, A.H.; Alvarez-Vázquez, E.; Mendoza-Zanella, R.M.; Pérez-Olea, V.; Rosas-Fernández, C. Detection of Transitory Myocardial Ischemia Secondary to Perinatal Asphyxia. *Arch Med Res* **2000**, *31*, 377–383, doi:10.1016/s0188-4409(00)00088-6.
99. Dietrich, W.D.; Busto, R.; Bethea, J.R. Postischemic Hypothermia and IL-10 Treatment Provide Long-Lasting Neuroprotection of CA1 Hippocampus Following Transient Global Ischemia in Rats. *Exp Neurol* **1999**, *158*, 444–450, doi:10.1006/exnr.1999.7115.
100. McCarthy, K.D.; de Vellis, J. Preparation of Separate Astroglial and Oligodendroglial Cell Cultures from Rat Cerebral Tissue. *J Cell Biol* **1980**, *85*, 890–902, doi:10.1083/jcb.85.3.890.
101. Erecińska, M.; Silver, I.A. Tissue Oxygen Tension and Brain Sensitivity to Hypoxia. *Respir Physiol* **2001**, *128*, 263–276, doi:10.1016/s0034-5687(01)00306-1.
102. Carreau, A.; El Hafny-Rahbi, B.; Matejuk, A.; Grillon, C.; Kieda, C. Why Is the Partial Oxygen Pressure of Human Tissues a Crucial Parameter? Small Molecules and Hypoxia. *J Cell Mol Med* **2011**, *15*, 1239–1253, doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x.
103. Zhang, K.; Zhu, L.; Fan, M. Oxygen, a Key Factor Regulating Cell Behavior during Neurogenesis and Cerebral Diseases. *Front Mol Neurosci* **2011**, *4*, 5, doi:10.3389/fnmol.2011.00005.
104. Bordt, E.A. The Importance of Controlling in Vitro Oxygen Tension to Accurately Model in Vivo Neurophysiology. *Neurotoxicology* **2018**, *66*, 213–220, doi:10.1016/j.neuro.2017.10.008.
105. Jagannathan, L.; Cuddapah, S.; Costa, M. Oxidative Stress under Ambient and Physiological Oxygen Tension in Tissue Culture. *Curr Pharmacol Rep* **2016**, *2*, 64–72, doi:10.1007/s40495-016-0050-5.
106. Yang, T.; Dai, Y.; Chen, G.; Cui, S. Dissecting the Dual Role of the Glial Scar and Scar-Forming Astrocytes in Spinal Cord Injury. *Front Cell Neurosci* **2020**, *14*, 78, doi:10.3389/fncel.2020.00078.
107. Wasseff, S.K.; Scherer, S.S. Cx32 and Cx47 Mediate Oligodendrocyte: Astrocyte and Oligodendrocyte: Oligodendrocyte Gap Junction Coupling. *Neurobiol Dis* **2011**, *42*, 506–513, doi:10.1016/j.nbd.2011.03.003.
108. Lana, D.; Ugolini, F.; Nosi, D.; Wenk, G.L.; Giovannini, M.G. The Emerging Role of the Interplay Among Astrocytes, Microglia, and Neurons in the Hippocampus in Health and Disease. *Front Aging Neurosci* **2021**, *13*, 651973, doi:10.3389/fnagi.2021.651973.
109. Matejuk, A.; Ransohoff, R.M. Crosstalk Between Astrocytes and Microglia: An Overview. *Front Immunol* **2020**, *11*, 1416, doi:10.3389/fimmu.2020.01416.
110. Liu, Y.; Li, H.; Hu, J.; Wu, Z.; Meng, J.; Hayashi, Y.; Nakanishi, H.; Qing, H.; Ni, J. Differential Expression and Distinct Roles of Proteinase-Activated Receptor 2 in Microglia and Neurons in Neonatal Mouse Brain After Hypoxia-Ischemic Injury. *Mol Neurobiol* **2022**, *59*, 717–730, doi:10.1007/s12035-021-02594-5.
111. Domingues, H.S.; Portugal, C.C.; Socodato, R.; Relvas, J.B. Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. *Front Cell Dev Biol* **2016**, *4*, 71, doi:10.3389/fcell.2016.00071.

112. Yang, J.; Wang, T.; Jin, X.; Wang, G.; Zhao, F.; Jin, Y. Roles of Crosstalk between Astrocytes and Microglia in Triggering Neuroinflammation and Brain Edema Formation in 1,2-Dichloroethane-Intoxicated Mice. *Cells* **2021**, *10*, 2647, doi:10.3390/cells10102647.
113. Silwedel, C.; Speer, C.P.; Haarmann, A.; Fehrholz, M.; Claus, H.; Buttmann, M.; Glaser, K. Novel Insights into Neuroinflammation: Bacterial Lipopolysaccharide, Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , and Ureaplasma Species Differentially Modulate Atypical Chemokine Receptor 3 Responses in Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *J Neuroinflammation* **2018**, *15*, 156, doi:10.1186/s12974-018-1170-0.
114. Karababa, A.; Groos-Sahr, K.; Albrecht, U.; Keitel, V.; Shafigullina, A.; Görg, B.; Häussinger, D. Ammonia Attenuates LPS-Induced Upregulation of Pro-Inflammatory Cytokine mRNA in Co-Cultured Astrocytes and Microglia. *Neurochem Res* **2017**, *42*, 737–749, doi:10.1007/s11064-016-2060-4.
115. Ghosh, M.; Xu, Y.; Pearse, D.D. Cyclic AMP Is a Key Regulator of M1 to M2a Phenotypic Conversion of Microglia in the Presence of Th2 Cytokines. *J Neuroinflammation* **2016**, *13*, 9, doi:10.1186/s12974-015-0463-9.
116. Yao, S.-Y.; Natarajan, C.; Sriram, S. NNOS Mediated Mitochondrial Injury in LPS Stimulated Oligodendrocytes. *Mitochondrion* **2012**, *12*, 336–344, doi:10.1016/j.mito.2012.01.002.
117. Ziemka-Nalecz, M.; Janowska, J.; Strojek, L.; Jaworska, J.; Zalewska, T.; Frontczak-Baniewicz, M.; Sypecka, J. Impact of Neonatal Hypoxia-Ischaemia on Oligodendrocyte Survival, Maturation and Myelinating Potential. *J Cell Mol Med* **2018**, *22*, 207–222, doi:10.1111/jcmm.13309.
118. Altamentova, S.; Rumajogee, P.; Hong, J.; Beldick, S.R.; Park, S.J.; Yee, A.; Fehlings, M.G. Methylprednisolone Reduces Persistent Post-Ischemic Inflammation in a Rat Hypoxia-Ischemia Model of Perinatal Stroke. *Transl Stroke Res* **2020**, *11*, 1117–1136, doi:10.1007/s12975-020-00792-2.
119. Janowska, J.; Gargas, J.; Ziemka-Nalecz, M.; Zalewska, T.; Sypecka, J. Oligodendrocyte Response to Pathophysiological Conditions Triggered by Episode of Perinatal Hypoxia-Ischemia: Role of IGF-1 Secretion by Glial Cells. *Mol Neurobiol* **2020**, *57*, 4250–4268, doi:10.1007/s12035-020-02015-z.
120. Pérez, M.J.; Fernandez, N.; Pasquini, J.M. Oligodendrocyte Differentiation and Signaling after Transferrin Internalization: A Mechanism of Action. *Exp Neurol* **2013**, *248*, 262–274, doi:10.1016/j.expneurol.2013.06.014.
121. van Strien, M.E.; Brevé, J.J.P.; Fratantoni, S.; Schreurs, M.W.J.; Bol, J.G.J.M.; Jongenelen, C.A.M.; Drukarch, B.; van Dam, A.-M. Astrocyte-Derived Tissue Transglutaminase Interacts with Fibronectin: A Role in Astrocyte Adhesion and Migration? *PLoS One* **2011**, *6*, e25037, doi:10.1371/journal.pone.0025037.
122. Werkman, I.L.; Lentferink, D.H.; Baron, W. Macroglial Diversity: White and Grey Areas and Relevance to Remyelination. *Cell Mol Life Sci* **2021**, *78*, 143–171, doi:10.1007/s00018-020-03586-9.
123. Kang, M.; Yao, Y. Laminin Regulates Oligodendrocyte Development and Myelination. *Glia* **2022**, *70*, 414–429, doi:10.1002/glia.24117.
124. Jia, M.; Shi, Z.; Yan, X.; Xu, L.; Dong, L.; Li, J.; Wang, Y.; Yang, S.; Yuan, F. Insulin and Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-like Growth Factor Synergistically Promote Astrocyte Survival and Proliferation in Serum-Free Medium. *J Neurosci Methods* **2018**, *307*, 240–247, doi:10.1016/j.jneumeth.2018.06.002.
125. Chalak, L.F.; Sánchez, P.J.; Adams-Huet, B.; Luptook, A.R.; Heyne, R.J.; Rosenfeld, C.R. Biomarkers for Severity of Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy and Outcomes in Newborns Receiving Hypothermia Therapy. *J Pediatr* **2014**, *164*, 468-474.e1, doi:10.1016/j.jpeds.2013.10.067.
126. Li, D.; Liu, X.; Liu, T.; Liu, H.; Tong, L.; Jia, S.; Wang, Y.-F. Neurochemical Regulation of the Expression and Function of Glial Fibrillary Acidic Protein in Astrocytes. *Glia* **2020**, *68*, 878–897, doi:10.1002/glia.23734.

127. Brenner, M.; Messing, A. Regulation of GFAP Expression. *ASN Neuro* **2021**, *13*, 1759091420981206, doi:10.1177/1759091420981206.
128. Florio, P.; Abella, R.; Marinoni, E.; Di Iorio, R.; Li Volti, G.; Galvano, F.; Pongiglione, G.; Frigiola, A.; Pinzauti, S.; Petraglia, F.; et al. Biochemical Markers of Perinatal Brain Damage. *Front Biosci (Schol Ed)* **2010**, *2*, 47–72, doi:10.2741/s45.
129. Wu, P.-M.; Lin, C.-H.; Lee, H.-T.; Shih, H.-I.; Huang, C.-C.; Tu, Y.-F. Early Blood Biomarkers Distinguish Inflammation from Neonatal Hypoxic-Ischemia Encephalopathy. *Neurochem Res* **2020**, *45*, 2712–2722, doi:10.1007/s11064-020-03119-7.
130. Pimentel, V.C.; Pinheiro, F.V.; De Bona, K.S.; Maldonado, P.A.; da Silva, C.R.; de Oliveira, S.M.; Ferreira, J.; Bertoncheli, C.M.; Schetinger, M.R.; Da Luz, S.C.A.; et al. Hypoxic-Ischemic Brain Injury Stimulates Inflammatory Response and Enzymatic Activities in the Hippocampus of Neonatal Rats. *Brain Res* **2011**, *1388*, 134–140, doi:10.1016/j.brainres.2011.01.108.
131. Xue, R.; Pan, S.; Guo, D. Effect of Hyperbaric Oxygen on Myelin Injury and Repair after Hypoxic-Ischemic Brain Damage in Adult Rat. *Neurosci Lett* **2023**, *794*, 137015, doi:10.1016/j.neulet.2022.137015.
132. Sanches, E.F.; van de Looij, Y.; Toulotte, A.; Sizonenko, S.V.; Lei, H. Mild Neonatal Brain Hypoxia-Ischemia in Very Immature Rats Causes Long-Term Behavioral and Cerebellar Abnormalities at Adulthood. *Frontiers in Physiology* **2019**, *10*.
133. Järlestedt, K.; Rousset, C.I.; Faiz, M.; Wilhelmsson, U.; Ståhlberg, A.; Sourkova, H.; Pekna, M.; Mallard, C.; Hagberg, H.; Pekny, M. Attenuation of Reactive Gliosis Does Not Affect Infarct Volume in Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Mice. *PLoS One* **2010**, *5*, e10397, doi:10.1371/journal.pone.0010397.
134. van Asperen, J.V.; Robe, P.A.J.T.; Hol, E.M. GFAP Alternative Splicing and the Relevance for Disease - A Focus on Diffuse Gliomas. *ASN Neuro* **2022**, *14*, 17590914221102064, doi:10.1177/17590914221102065.
135. He, Y.; Hakvoort, T.B.M.; Vermeulen, J.L.M.; Labruyère, W.T.; De Waart, D.R.; Van Der Hel, W.S.; Ruijter, J.M.; Uylings, H.B.M.; Lamers, W.H. Glutamine Synthetase Deficiency in Murine Astrocytes Results in Neonatal Death. *Glia* **2010**, *58*, 741–754, doi:10.1002/glia.20960.
136. Anlauf, E.; Derouiche, A. Glutamine Synthetase as an Astrocytic Marker: Its Cell Type and Vesicle Localization. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2013**, *4*, 144, doi:10.3389/fendo.2013.00144.
137. Rose, C.F.; Verkhatsky, A.; Parpura, V. Astrocyte Glutamine Synthetase: Pivotal in Health and Disease. *Biochem Soc Trans* **2013**, *41*, 1518–1524, doi:10.1042/BST20130237.
138. Chawla, A.R.; Johnson, D.E.; Zybura, A.S.; Leeds, B.P.; Nelson, R.M.; Hudmon, A. Constitutive Regulation of the Glutamate/Aspartate Transporter EAAT1 by Calcium-Calmodulin-Dependent Protein Kinase II. *J Neurochem* **2017**, *140*, 421–434, doi:10.1111/jnc.13913.
139. Kovermann, P.; Engels, M.; Müller, F.; Fahlke, C. Cellular Physiology and Pathophysiology of EAAT Anion Channels. *Front Cell Neurosci* **2021**, *15*, 815279, doi:10.3389/fncel.2021.815279.
140. Beart, P.M.; O’Shea, R.D. Transporters for L-Glutamate: An Update on Their Molecular Pharmacology and Pathological Involvement. *Br J Pharmacol* **2007**, *150*, 5–17, doi:10.1038/sj.bjp.0706949.
141. Dallas, M.; Boycott, H.E.; Atkinson, L.; Miller, A.; Boyle, J.P.; Pearson, H.A.; Peers, C. Hypoxia Suppresses Glutamate Transport in Astrocytes. *J Neurosci* **2007**, *27*, 3946–3955, doi:10.1523/JNEUROSCI.5030-06.2007.
142. Dao, D.N.; Ahdab-Barmada, M.; Schor, N.F. Cerebellar Glutamine Synthetase in Children after Hypoxia or Ischemia. *Stroke* **1991**, *22*, 1312–1316, doi:10.1161/01.str.22.10.1312.
143. Sen, E.; Basu, A.; Willing, L.B.; Uliasz, T.F.; Myrkalo, J.L.; Vannucci, S.J.; Hewett, S.J.; Levison, S.W. Pre-Conditioning Induces the Precocious Differentiation of Neonatal Astrocytes to Enhance Their Neuroprotective Properties. *ASN Neuro* **2011**, *3*, e00062, doi:10.1042/AN20100029.
144. Faissner, A.; Pyka, M.; Geissler, M.; Sobik, T.; Frischknecht, R.; Gundelfinger, E.D.; Seidenbecher, C. Contributions of Astrocytes to Synapse Formation and Maturation - Potential Functions of the Perisynaptic Extracellular Matrix. *Brain Res Rev* **2010**, *63*, 26–38, doi:10.1016/j.brainresrev.2010.01.001.

145. Song, I.; Dityatev, A. Crosstalk between Glia, Extracellular Matrix and Neurons. *Brain Res Bull* **2018**, *136*, 101–108, doi:10.1016/j.brainresbull.2017.03.003.
146. Long, K.R.; Huttner, W.B. How the Extracellular Matrix Shapes Neural Development. *Open Biol* **2019**, *9*, 180216, doi:10.1098/rsob.180216.
147. Walma, D.A.C.; Yamada, K.M. The Extracellular Matrix in Development. *Development* **2020**, *147*, dev175596, doi:10.1242/dev.175596.
148. Lourenço, T.; Paes de Faria, J.; Bippes, C.A.; Maia, J.; Lopes-da-Silva, J.A.; Relvas, J.B.; Grãos, M. Modulation of Oligodendrocyte Differentiation and Maturation by Combined Biochemical and Mechanical Cues. *Sci Rep* **2016**, *6*, 21563, doi:10.1038/srep21563.
149. Suzuki, N.; Hyodo, M.; Hayashi, C.; Mabuchi, Y.; Sekimoto, K.; Onchi, C.; Sekiguchi, K.; Akazawa, C. Laminin A2, A4, and A5 Chains Positively Regulate Migration and Survival of Oligodendrocyte Precursor Cells. *Sci Rep* **2019**, *9*, 19882, doi:10.1038/s41598-019-56488-7.
150. Milner, R.; Edwards, G.; Streuli, C.; Ffrench-Constant, C. A Role in Migration for the Alpha V Beta 1 Integrin Expressed on Oligodendrocyte Precursors. *J Neurosci* **1996**, *16*, 7240–7252, doi:10.1523/JNEUROSCI.16-22-07240.1996.
151. Eyermann, C.; Czaplinski, K.; Colognato, H. Dystroglycan Promotes Filopodial Formation and Process Branching in Differentiating Oligodendroglia. *J Neurochem* **2012**, *120*, 928–947, doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07600.x.
152. Sun, Y.; Deng, Y.; Xiao, M.; Hu, L.; Li, Z.; Chen, C. Chondroitin Sulfate Proteoglycans Inhibit the Migration and Differentiation of Oligodendrocyte Precursor Cells and Its Counteractive Interaction with Laminin. *Int J Mol Med* **2017**, *40*, 1657–1668, doi:10.3892/ijmm.2017.3153.
153. Hu, J.; Deng, L.; Wang, X.; Xu, X.-M. Effects of Extracellular Matrix Molecules on the Growth Properties of Oligodendrocyte Progenitor Cells in Vitro. *J Neurosci Res* **2009**, *87*, 2854–2862, doi:10.1002/jnr.22111.
154. Sosunov, A.A.; Wu, X.; Tsankova, N.M.; Guilfoyle, E.; McKhann, G.M.; Goldman, J.E. Phenotypic Heterogeneity and Plasticity of Isocortical and Hippocampal Astrocytes in the Human Brain. *J Neurosci* **2014**, *34*, 2285–2298, doi:10.1523/JNEUROSCI.4037-13.2014.
155. Shu, J.; Fang, X.-H.; Li, Y.-J.; Deng, Y.; Wei, W.-S.; Zhang, L. Microglia-Induced Autophagic Death of Neurons via IL-6/STAT3/MiR-30d Signaling Following Hypoxia/Ischemia. *Mol Biol Rep* **2022**, *49*, 7697–7707, doi:10.1007/s11033-022-07587-8.
156. Bohlen, C.J.; Bennett, F.C.; Tucker, A.F.; Collins, H.Y.; Mulinyawe, S.B.; Barres, B.A. Diverse Requirements for Microglial Survival, Specification, and Function Revealed by Defined-Medium Cultures. *Neuron* **2017**, *94*, 759-773.e8, doi:10.1016/j.neuron.2017.04.043.
157. Ziabska, K.; Gargas, J.; Sypecka, J.; Ziemka-Nalecz, M. The Impact of the Histone Deacetylase Inhibitor Sodium Butyrate on Microglial Polarization after Oxygen and Glucose Deprivation. *Pharmacol Rep* **2022**, *74*, 909–919, doi:10.1007/s43440-022-00384-x.
158. De Vries, G.H.; Boullerne, A.I. Glial Cell Lines: An Overview. *Neurochem Res* **2010**, *35*, 1978–2000, doi:10.1007/s11064-010-0318-9.
159. Stansley, B.; Post, J.; Hensley, K. A Comparative Review of Cell Culture Systems for the Study of Microglial Biology in Alzheimer’s Disease. *J Neuroinflammation* **2012**, *9*, 115, doi:10.1186/1742-2094-9-115.
160. Das, A.; Kim, S.H.; Arifuzzaman, S.; Yoon, T.; Chai, J.C.; Lee, Y.S.; Park, K.S.; Jung, K.H.; Chai, Y.G. Transcriptome Sequencing Reveals That LPS-Triggered Transcriptional Responses in Established Microglia BV2 Cell Lines Are Poorly Representative of Primary Microglia. *J Neuroinflammation* **2016**, *13*, 182, doi:10.1186/s12974-016-0644-1.
161. He, Y.; Yao, X.; Taylor, N.; Bai, Y.; Lovenberg, T.; Bhattacharya, A. RNA Sequencing Analysis Reveals Quiescent Microglia Isolation Methods from Postnatal Mouse Brains and Limitations of BV2 Cells. *J Neuroinflammation* **2018**, *15*, 153, doi:10.1186/s12974-018-1195-4.
162. Gao, Y.; Xie, D.; Wang, Y.; Niu, L.; Jiang, H. Short-Chain Fatty Acids Reduce Oligodendrocyte Precursor Cells Loss by Inhibiting the Activation of Astrocytes via the SGK1/IL-6 Signalling Pathway. *Neurochem Res* **2022**, *47*, 3476–3489, doi:10.1007/s11064-022-03710-0.

163. Chaparro-Huerta, V.; Flores-Soto, M.E.; Merin Sigala, M.E.; Barrera de León, J.C.; Lemus-Varela, M. de L.; Torres-Mendoza, B.M. de G.; Beas-Zárate, C. Proinflammatory Cytokines, Enolase and S-100 as Early Biochemical Indicators of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy Following Perinatal Asphyxia in Newborns. *Pediatr Neonatol* **2017**, *58*, 70–76, doi:10.1016/j.pedneo.2016.05.001.
164. Sofroniew, M.V. Astrocyte Barriers to Neurotoxic Inflammation. *Nat Rev Neurosci* **2015**, *16*, 249–263, doi:10.1038/nrn3898.
165. Mojsilovic-Petrovic, J.; Callaghan, D.; Cui, H.; Dean, C.; Stanimirovic, D.B.; Zhang, W. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) Is Involved in the Regulation of Hypoxia-Stimulated Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1/CCL2) and MCP-5 (Ccl12) in Astrocytes. *J Neuroinflammation* **2007**, *4*, 12, doi:10.1186/1742-2094-4-12.
166. Bonestroo, H.J.C.; Heijnen, C.J.; Groenendaal, F.; van Bel, F.; Nijboer, C.H. Development of Cerebral Gray and White Matter Injury and Cerebral Inflammation over Time after Inflammatory Perinatal Asphyxia. *Dev Neurosci* **2015**, *37*, 78–94, doi:10.1159/000368770.
167. Back, S.A. Cerebral White and Gray Matter Injury in Newborns: New Insights into Pathophysiology and Management. *Clin Perinatol* **2014**, *41*, 1–24, doi:10.1016/j.clp.2013.11.001.
168. Long, K.L.P.; Breton, J.M.; Barraza, M.K.; Perloff, O.S.; Kaufer, D. Hormonal Regulation of Oligodendrogenesis I: Effects across the Lifespan. *Biomolecules* **2021**, *11*, 283, doi:10.3390/biom11020283.
169. Dyer, A.H.; Vahdatpour, C.; Sanfeliu, A.; Tropea, D. The Role of Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) in Brain Development, Maturation and Neuroplasticity. *Neuroscience* **2016**, *325*, 89–99, doi:10.1016/j.neuroscience.2016.03.056.
170. Ziemka-Nalecz, M.; Jaworska, J.; Zalewska, T. Insights Into the Neuroinflammatory Responses After Neonatal Hypoxia-Ischemia. *J Neuropathol Exp Neurol* **2017**, *76*, 644–654, doi:10.1093/jnen/nlx046.
171. Pang, Y.; Fan, L.-W.; Tien, L.-T.; Dai, X.; Zheng, B.; Cai, Z.; Lin, R.C.S.; Bhatt, A. Differential Roles of Astrocyte and Microglia in Supporting Oligodendrocyte Development and Myelination in Vitro. *Brain Behav* **2013**, *3*, 503–514, doi:10.1002/brb3.152.
172. Lingam, I.; Avdic-Belltheus, A.; Meehan, C.; Martinello, K.; Ragab, S.; Peebles, D.; Barkhuizen, M.; Tann, C.J.; Tachtsidis, I.; Wolfs, T.G.A.M.; et al. Serial Blood Cytokine and Chemokine mRNA and MicroRNA over 48 h Are Insult Specific in a Piglet Model of Inflammation-Sensitized Hypoxia-Ischaemia. *Pediatr Res* **2021**, *89*, 464–475, doi:10.1038/s41390-020-0986-3.
173. Imam, S.S.; Gad, G.I.; Atef, S.H.; Shawky, M.A. Cord Blood Brain Derived Neurotrophic Factor: Diagnostic and Prognostic Marker in Fullterm Newborns with Perinatal Asphyxia. *Pak J Biol Sci* **2009**, *12*, 1498–1504, doi:10.3923/pjbs.2009.1498.1504.
174. Chen, A.; Xiong, L.-J.; Tong, Y.; Mao, M. The Neuroprotective Roles of BDNF in Hypoxic Ischemic Brain Injury. *Biomed Rep* **2013**, *1*, 167–176, doi:10.3892/br.2012.48.
175. Xiong, L.-L.; Chen, J.; Du, R.-L.; Liu, J.; Chen, Y.-J.; Hawwas, M.A.; Zhou, X.-F.; Wang, T.-H.; Yang, S.-J.; Bai, X. Brain-Derived Neurotrophic Factor and Its Related Enzymes and Receptors Play Important Roles after Hypoxic-Ischemic Brain Damage. *Neural Regen Res* **2021**, *16*, 1453–1459, doi:10.4103/1673-5374.303033.
176. Chen, J.; Sun, M.; Zhang, X.; Miao, Z.; Chua, B.H.L.; Hamdy, R.C.; Zhang, Q.-G.; Liu, C.-F.; Xu, X. Increased Oligodendrogenesis by Humanin Promotes Axonal Remyelination and Neurological Recovery in Hypoxic/Ischemic Brains. *Hippocampus* **2015**, *25*, 62–71, doi:10.1002/hipo.22350.
177. Araki, T.; Ikegaya, Y.; Koyama, R. The Effects of Microglia- and Astrocyte-Derived Factors on Neurogenesis in Health and Disease. *Eur J Neurosci* **2021**, *54*, 5880–5901, doi:10.1111/ejn.14969.
178. Rubio, N. Mouse Astrocytes Store and Deliver Brain-Derived Neurotrophic Factor Using the Non-Catalytic Gp95trkB Receptor. *Eur J Neurosci* **1997**, *9*, 1847–1853, doi:10.1111/j.1460-9568.1997.tb00751.x.
179. Wang, S.; Yao, H.; Xu, Y.; Hao, R.; Zhang, W.; Liu, H.; Huang, Y.; Guo, W.; Lu, B. Therapeutic Potential of a TrkB Agonistic Antibody for Alzheimer's Disease. *Theranostics* **2020**, *10*, 6854–6874, doi:10.7150/thno.44165.

180. Wurzelmann, M.; Romeika, J.; Sun, D. Therapeutic Potential of Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) and a Small Molecular Mimics of BDNF for Traumatic Brain Injury. *Neural Regen Res* **2017**, *12*, 7–12, doi:10.4103/1673-5374.198964.
181. Soderquist, R.G.; Milligan, E.D.; Sloane, E.M.; Harrison, J.A.; Douvas, K.K.; Potter, J.M.; Hughes, T.S.; Chavez, R.A.; Johnson, K.; Watkins, L.R.; et al. PEGylation of Brain-Derived Neurotrophic Factor for Preserved Biological Activity and Enhanced Spinal Cord Distribution. *J Biomed Mater Res A* **2009**, *91*, 719–729, doi:10.1002/jbm.a.32254.
182. Poduslo, J.F.; Curran, G.L. Permeability at the Blood-Brain and Blood-Nerve Barriers of the Neurotrophic Factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. *Brain Res Mol Brain Res* **1996**, *36*, 280–286, doi:10.1016/0169-328x(95)00250-v.
183. Guo, W.; Pang, K.; Chen, Y.; Wang, S.; Li, H.; Xu, Y.; Han, F.; Yao, H.; Liu, H.; Lopes-Rodrigues, V.; et al. TrkB Agonistic Antibodies Superior to BDNF: Utility in Treating Motoneuron Degeneration. *Neurobiol Dis* **2019**, *132*, 104590, doi:10.1016/j.nbd.2019.104590.
184. Fletcher, J.M.; Hughes, R.A. Modified Low Molecular Weight Cyclic Peptides as Mimetics of BDNF with Improved Potency, Proteolytic Stability and Transmembrane Passage in Vitro. *Bioorg Med Chem* **2009**, *17*, 2695–2702, doi:10.1016/j.bmc.2009.02.053.
185. Huang, J.; Zhang, L.; Qu, Y.; Zhou, Y.; Zhu, J.; Li, Y.; Zhu, T.; Zhao, F.; Tang, J.; Mu, D. Histone Acetylation of Oligodendrocytes Protects against White Matter Injury Induced by Inflammation and Hypoxia-Ischemia through Activation of BDNF-TrkB Signaling Pathway in Neonatal Rats. *Brain Res* **2018**, *1688*, 33–46, doi:10.1016/j.brainres.2017.11.005.
186. Miyamoto, N.; Maki, T.; Shindo, A.; Liang, A.C.; Maeda, M.; Egawa, N.; Itoh, K.; Lo, E.K.; Lok, J.; Ihara, M.; et al. Astrocytes Promote Oligodendrogenesis after White Matter Damage via Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Journal of Neuroscience* **2015**, *35*, 14002–14008, doi:10.1523/JNEUROSCI.1592-15.2015.
187. Wang, Y.; Cao, M.; Liu, A.; Di, W.; Zhao, F.; Tian, Y.; Jia, J. Changes of Inflammatory Cytokines and Neurotrophins Emphasized Their Roles in Hypoxic-Ischemic Brain Damage. *Int J Neurosci* **2013**, *123*, 191–195, doi:10.3109/00207454.2012.744755.
188. Hammarlund, M.E.; Ek, C.J.; Akar, S.; Karlsson, A.; Pattanaik, B.; Mjörnstedt, F.; Svedin, P.; Ardalan, M.; Rocha-Ferreira, E.; Mallard, C.; et al. The Alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor Does Not Affect Neonatal Brain Injury. *Biomedicines* **2022**, *10*, 2023, doi:10.3390/biomedicines10082023.
189. Mallard, C.; Vexler, Z. Modeling Ischemia in the Immature Brain: How Translational Are Animal Models? *Stroke* **2015**, *46*, 3006–3011, doi:10.1161/STROKEAHA.115.007776.
190. Wu, F.; Zhao, Y.; Jiao, T.; Shi, D.; Zhu, X.; Zhang, M.; Shi, M.; Zhou, H. CXCR2 Is Essential for Cerebral Endothelial Activation and Leukocyte Recruitment during Neuroinflammation. *J Neuroinflammation* **2015**, *12*, 98, doi:10.1186/s12974-015-0316-6.
191. Shi, Y.; Yi, Z.; Zhao, P.; Xu, Y.; Pan, P. MicroRNA-532-5p Protects against Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury by Directly Targeting CXCL1. *Aging (Albany NY)* **2021**, *13*, 11528–11541, doi:10.18632/aging.202846.
192. Yang, C.; Feng, Z.; Deng, H.; Dai, L.; He, L.; Yin, L.; Zhao, J. CXCL1/CXCR2 Is Involved in White Matter Injury in Neonatal Rats via the Gut-Brain Axis. *BMC Neurosci* **2022**, *23*, 67, doi:10.1186/s12868-022-00749-1.
193. Yellowhair, T.R.; Noor, S.; Maxwell, J.R.; Anstine, C.V.; Oppong, A.Y.; Robinson, S.; Milligan, E.D.; Jantzie, L.L. Preclinical Chorioamnionitis Dysregulates CXCL1/CXCR2 Signaling throughout the Placental-Fetal-Brain Axis. *Exp Neurol* **2018**, *301*, 110–119, doi:10.1016/j.expneurol.2017.11.002.
194. Piotrowska, A.; Ciapała, K.; Pawlik, K.; Kwiatkowski, K.; Rojewska, E.; Mika, J. Comparison of the Effects of Chemokine Receptors CXCR2 and CXCR3 Pharmacological Modulation in Neuropathic Pain Model-In Vivo and In Vitro Study. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, 11074, doi:10.3390/ijms222011074.
195. Filipovic, R.; Jakovcevski, I.; Zecevic, N. GRO-Alpha and CXCR2 in the Human Fetal Brain and Multiple Sclerosis Lesions. *Dev Neurosci* **2003**, *25*, 279–290, doi:10.1159/000072275.

196. Bajetto, A.; Bonavia, R.; Barbero, S.; Florio, T.; Schettini, G. Chemokines and Their Receptors in the Central Nervous System. *Front Neuroendocrinol* **2001**, *22*, 147–184, doi:10.1006/frne.2001.0214.
197. Cardona, A.E.; Li, M.; Liu, L.; Savarin, C.; Ransohoff, R.M. Chemokines in and out of the Central Nervous System: Much More than Chemotaxis and Inflammation. *J Leukoc Biol* **2008**, *84*, 587–594, doi:10.1189/jlb.1107763.
198. Skinner, D.D.; Lane, T.E. CXCR2 Signaling and Remyelination in Preclinical Models of Demyelination. *DNA Cell Biol* **2020**, *39*, 3–7, doi:10.1089/dna.2019.5182.
199. Nguyen, D.; Stangel, M. Expression of the Chemokine Receptors CXCR1 and CXCR2 in Rat Oligodendroglial Cells. *Brain Res Dev Brain Res* **2001**, *128*, 77–81, doi:10.1016/s0165-3806(01)00128-6.
200. Cho, K.H.; Choi, J.I.; Kim, J.-O.; Jung, J.E.; Kim, D.-W.; Kim, M. Therapeutic Mechanism of Cord Blood Mononuclear Cells via the IL-8-Mediated Angiogenic Pathway in Neonatal Hypoxic-Ischaemic Brain Injury. *Sci Rep* **2020**, *10*, 4446, doi:10.1038/s41598-020-61441-0.
201. Tsai, H.-H.; Frost, E.; To, V.; Robinson, S.; Ffrench-Constant, C.; Geertman, R.; Ransohoff, R.M.; Miller, R.H. The Chemokine Receptor CXCR2 Controls Positioning of Oligodendrocyte Precursors in Developing Spinal Cord by Arresting Their Migration. *Cell* **2002**, *110*, 373–383, doi:10.1016/s0092-8674(02)00838-3.
202. Padovani-Claudio, D.A.; Liu, L.; Ransohoff, R.M.; Miller, R.H. Alterations in the Oligodendrocyte Lineage, Myelin, and White Matter in Adult Mice Lacking the Chemokine Receptor CXCR2. *Glia* **2006**, *54*, 471–483, doi:10.1002/glia.20383.
203. Vallès, A.; Grijpink-Ongering, L.; de Bree, F.M.; Tuinstra, T.; Ronken, E. Differential Regulation of the CXCR2 Chemokine Network in Rat Brain Trauma: Implications for Neuroimmune Interactions and Neuronal Survival. *Neurobiol Dis* **2006**, *22*, 312–322, doi:10.1016/j.nbd.2005.11.015.
204. Tian, Y.; Yin, H.; Deng, X.; Tang, B.; Ren, X.; Jiang, T. CXCL12 Induces Migration of Oligodendrocyte Precursor Cells through the CXCR4-Activated MEK/ERK and PI3K/AKT Pathways. *Mol Med Rep* **2018**, *18*, 4374–4380, doi:10.3892/mmr.2018.9444.
205. Du, Y.; Deng, W.; Wang, Z.; Ning, M.; Zhang, W.; Zhou, Y.; Lo, E.H.; Xing, C. Differential Subnetwork of Chemokines/Cytokines in Human, Mouse, and Rat Brain Cells after Oxygen-Glucose Deprivation. *J Cereb Blood Flow Metab* **2017**, *37*, 1425–1434, doi:10.1177/0271678X16656199.
206. Holman, D.W.; Klein, R.S.; Ransohoff, R.M. The Blood-Brain Barrier, Chemokines and Multiple Sclerosis. *Biochim Biophys Acta* **2011**, *1812*, 220–230, doi:10.1016/j.bbadis.2010.07.019.
207. Dziembowska, M.; Tham, T.N.; Lau, P.; Vitry, S.; Lazarini, F.; Dubois-Dalcq, M. A Role for CXCR4 Signaling in Survival and Migration of Neural and Oligodendrocyte Precursors. *Glia* **2005**, *50*, 258–269, doi:10.1002/glia.20170.
208. Maysami, S.; Nguyen, D.; Zobel, F.; Pitz, C.; Heine, S.; Höpfner, M.; Stangel, M. Modulation of Rat Oligodendrocyte Precursor Cells by the Chemokine CXCL12. *Neuroreport* **2006**, *17*, 1187–1190, doi:10.1097/01.wnr.0000227985.92551.9a.
209. Wang, X.; Li, C.; Chen, Y.; Hao, Y.; Zhou, W.; Chen, C.; Yu, Z. Hypoxia Enhances CXCR4 Expression Favoring Microglia Migration via HIF-1 $\alpha$  Activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2008**, *371*, 283–288, doi:10.1016/j.bbrc.2008.04.055.
210. Ge, Y.; Zhen, F.; Liu, Z.; Feng, Z.; Wang, G.; Zhang, C.; Wang, X.; Sun, Y.; Zheng, X.; Bai, Y.; et al. Alpha-Asaronol Alleviates Dysmyelination by Enhancing Glutamate Transport Through the Activation of PPAR $\gamma$ -GLT-1 Signaling in Hypoxia-Ischemia Neonatal Rats. *Front Pharmacol* **2022**, *13*, 766744, doi:10.3389/fphar.2022.766744.
211. Falahati, S.; Breu, M.; Waickman, A.T.; Phillips, A.W.; Arauz, E.J.; Snyder, S.; Porambo, M.; Goral, K.; Comi, A.M.; Wilson, M.A.; et al. Ischemia-Induced Neuroinflammation Is Associated with Disrupted Development of Oligodendrocyte Progenitors in a Model of Periventricular Leukomalacia. *Dev Neurosci* **2013**, *35*, 182–196, doi:10.1159/000346682.



212. Bonestroo, H.J.C.; Nijboer, C.H.A.; van Velthoven, C.T.J.; Kavelaars, A.; Hack, C.E.; van Bel, F.; Heijnen, C.J. Cerebral and Hepatic Inflammatory Response after Neonatal Hypoxia-Ischemia in Newborn Rats. *Dev Neurosci* **2013**, *35*, 197–211, doi:10.1159/000346685.
213. Watson, A.E.S.; Goodkey, K.; Footz, T.; Voronova, A. Regulation of CNS Precursor Function by Neuronal Chemokines. *Neurosci Lett* **2020**, *715*, 134533, doi:10.1016/j.neulet.2019.134533.
214. Tirotta, E.; Ransohoff, R.M.; Lane, T.E. CXCR2 Signaling Protects Oligodendrocyte Progenitor Cells from IFN- $\gamma$ /CXCL10-Mediated Apoptosis. *Glia* **2011**, *59*, 1518–1528, doi:10.1002/glia.21195.
215. Yasova Barbeau, D.; Krueger, C.; Huene, M.; Copenhaver, N.; Bennett, J.; Weaver, M.; Weiss, M.D. Heart Rate Variability and Inflammatory Markers in Neonates with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Physiol Rep* **2019**, *7*, e14110, doi:10.14814/phy2.14110.
216. Reschke, M.; Salvador, E.; Schlegel, N.; Burek, M.; Karnati, S.; Wunder, C.; Förster, C.Y. Isosteviol Sodium (STVNA) Reduces Pro-Inflammatory Cytokine IL-6 and GM-CSF in an In Vitro Murine Stroke Model of the Blood-Brain Barrier (BBB). *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1753, doi:10.3390/pharmaceutics14091753.
217. Franzen, R.; Bouhy, D.; Schoenen, J. Nervous System Injury: Focus on the Inflammatory Cytokine “Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor.” *Neurosci Lett* **2004**, *361*, 76–78, doi:10.1016/j.neulet.2003.12.018.
218. Falck, M.; Osredkar, D.; Wood, T.R.; Maes, E.; Flatebø, T.; Sabir, H.; Thoresen, M. Neonatal Systemic Inflammation Induces Inflammatory Reactions and Brain Apoptosis in a Pathogen-Specific Manner. *Neonatology* **2018**, *113*, 212–220, doi:10.1159/000481980.
219. Brochu, M.-E.; Girard, S.; Lavoie, K.; Sébire, G. Developmental Regulation of the Neuroinflammatory Responses to LPS and/or Hypoxia-Ischemia between Preterm and Term Neonates: An Experimental Study. *J Neuroinflammation* **2011**, *8*, 55, doi:10.1186/1742-2094-8-55.
220. Amantea, D.; Nappi, G.; Bernardi, G.; Bagetta, G.; Corasaniti, M.T. Post-Ischemic Brain Damage: Pathophysiology and Role of Inflammatory Mediators. *FEBS J* **2009**, *276*, 13–26, doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06766.x.
221. Leifsdottir, K.; Mehmet, H.; Eksborg, S.; Herlenius, E. Fas-Ligand and Interleukin-6 in the Cerebrospinal Fluid Are Early Predictors of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy and Long-Term Outcomes after Birth Asphyxia in Term Infants. *J Neuroinflammation* **2018**, *15*, 223, doi:10.1186/s12974-018-1253-y.
222. Xiong, M.; Yang, Y.; Chen, G.-Q.; Zhou, W.-H. Post-Ischemic Hypothermia for 24h in P7 Rats Rescues Hippocampal Neuron: Association with Decreased Astrocyte Activation and Inflammatory Cytokine Expression. *Brain Res Bull* **2009**, *79*, 351–357, doi:10.1016/j.brainresbull.2009.03.011.
223. Gu, Y.; He, M.; Zhou, X.; Liu, J.; Hou, N.; Bin, T.; Zhang, Y.; Li, T.; Chen, J. Endogenous IL-6 of Mesenchymal Stem Cell Improves Behavioral Outcome of Hypoxic-Ischemic Brain Damage Neonatal Rats by Suppressing Apoptosis in Astrocyte. *Sci Rep* **2016**, *6*, 18587, doi:10.1038/srep18587.
224. Xing, C.; Li, W.; Deng, W.; Ning, M.; Lo, E.H. A Potential Gliovascular Mechanism for Microglial Activation: Differential Phenotypic Switching of Microglia by Endothelium versus Astrocytes. *J Neuroinflammation* **2018**, *15*, 143, doi:10.1186/s12974-018-1189-2.
225. Tomecka, E.; Lech, W.; Zychowicz, M.; Sarnowska, A.; Murzyn, M.; Oldak, T.; Domanska-Janik, K.; Buzanska, L.; Rozwadowska, N. Assessment of the Neuroprotective and Stemness Properties of Human Wharton’s Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells under Variable (5% vs. 21%) Aerobic Conditions. *Cells* **2021**, *10*, 717, doi:10.3390/cells10040717.