

INSTYTUT MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ
IM. MIROSŁAWA MOSSAKOWSKIEGO
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

Katarzyna Drela

**Ocena potencjału neurogennego ludzkich mezenchymalnych
komórek macierzystych pochodzących z różnych źródeł: krwi i
sznura pępowinowego oraz szpiku kostnego**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. n. med. Krystyny Domańskiej-Janik

Zakład Neurobiologii Naprawczej
i Pracownia Bioinżynierii Komórek Macierzystych

WARSZAWA 2015

Wyniki umieszczone w niniejszej rozprawie doktorskiej częściowo zostały opublikowane w następujących pracach:

Drela K, Sarnowska A, Siedlecka P, Szablowska-Gadomska I, Wielgos M, Jurga M, Lukomska B, Domanska-Janik K. Low oxygen atmosphere facilitates proliferation and maintains undifferentiated state of umbilical cord mesenchymal stem cells in an hypoxia inducible factor-dependent manner. **Cytotherapy**. 2014 Jul;**16(7):881-92**.

Drela K, Siedlecka P, Sarnowska A, Domanska-Janik K. Human mesenchymal stem cells in the treatment of neurological diseases. **Acta Neurobiol Exp (Wars)**. 2013;**73(1):38-56**.

Drela K, Lech W, Mikula M, Sarnowska A, Domańska-Janik K. Wharton's Jelly derived MSCs, a distinct class of perinatal cells with enhanced neuro-therapeutic potential in comparison to bone marrows source (praca wysłana do redakcji czasopisma Stem Cell Research).

Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej rozprawie doktorskiej były finansowane w ramach projektów naukowo-badawczych: grantu nr 2011/01/B/NZ3/05401 oraz stypendium realizowanego w ramach Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki projekt "Rozwój nauki - rozwojem regionu - stypendia i wsparcie towarzyszące dla mazowieckich doktorantów" oraz tematu statutowego nr 23.

Chciałabym serdecznie podziękować
Pani Prof. dr hab. n. med. Krystynie Domańskiej-Janik
za możliwość wykonania niniejszej pracy,
jak również za nieocenione wsparcie merytoryczne.

Bardzo dziękuję Prof. dr hab. Barbarze Łukomskiej za wprowadzenie mnie
w magiczny świat mezenchymalnych komórek macierzystych
podczas pierwszych lat mojej pracy w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej.

Dziękuję również Kolegom i Koleżankom oraz wszystkim
pracownikom Zakładu Neurobiologii Naprawczej
za wszelką pomoc i życzliwość.

Szczególne podziękowania składam zaś mojej Rodzinie,
bez wsparcia której ta praca by nie powstała.

Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW.....	7
1. PRZEGLĄD LITERATURY	12
1.1. Źródła mezenchymalnych komórek macierzystych	14
1.2. Neuralny potencjał komórek MSC	15
1.3. Mechanizmy i ścieżki sygnałowe związane z różnicowaniem neuralnym MSC	18
1.3.1. Udział szlaku sygnałowego cAMP w różnicowaniu komórek MSC.....	18
1.3.2. Udział szlaku indukowanego kwasem retinowym w różnicowaniu komórek MSC	20
1.3.3. Udział szlaku sygnałowego indukowanego neurotrofinami w różnicowaniu komórek MSC.....	21
1.4. Koncepcja neuroektodermalnego pochodzenia subpopulacji komórek MSC	23
1.5. Epigenetyczna kontrola różnicowania MSC	26
1.6. Wpływ stężenia tlenu na hodowle komórek MSC.....	29
1.7. Zastosowanie mezenchymalnych komórek macierzystych w medycynie.....	34
1.8. Potencjalne ryzyko terapii komórkowych	37
2. CELE PRACY.....	39
3. MATERIAŁ.....	41
3.1. Izolacja ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych z galarety Whartona sznura pępowinowego (WJ-MS)	41
3.2. Izolacja ludzkich komórek macierzystych z krwi pępowinowej (frakcja komórek jednojądrzastych i mezenchymalnych komórek macierzystych)	42
3.3. Izolacja ludzkich komórek macierzystych ze szpiku kostnego (BM-MS)	44
4. METODY BADAŃ.....	46
4.1. Hodowla ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych	46
4.2. Zastosowanie warunków obniżonego stężenia tlenu	46
4.3. Weryfikacje fenotypu mezenchymalnego metodą cytometrii przepływowej.....	46
4.4. Ocena zdolności MSC do różnicowania w kierunku komórek mezodermu (osteocyty, chondrocyt, adipocyty).....	47
4.5. Ocena zdolności do różnicowania w kierunku neuralnym	48
4.6. Badanie proliferacji komórek MSC.....	50
4.6.1. Kolorymetryczna metoda z zastosowaniem odczynnika WST1	50
4.6.2. Metoda obliczania czasu podwajania populacji (PDT)	50
4.6.3. Immunocytochemiczna analiza ekspresji białka Ki-67	51
4.6.4. Pomiar powierzchni komórek	51
4.7. Analiza ekspresji genów na poziomie mRNA	51
4.7.1. Izolacja całkowitego RNA	51
4.7.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT)	52
4.7.3. Reakcja PCR z zastosowaniem Taq PCR Core KIT (Qiagen)	52

4.7.4.	Rozdział elektroforetyczny.....	52
4.7.5.	Reakcja qPCR w czasie rzeczywistym z zastosowaniem SYBR green PCR Master MIX	53
4.7.6.	Analiza ekspresji HIF-1 α i HIF-2 α z zastosowaniem sond hybrydacyjnych TaqMan.....	57
4.8.	Analiza immunocytochemiczna	58
4.9.	Analiza statystyczna	60
5.	WYNIKI	61
5.1.	Ustalenie procedury otrzymywania, identyfikacja oraz optymalizacja warunków hodowli ludzkich komórek MSC pochodzących z tkanek popłodowych (WJ-MSC i UCB-MSC) oraz ze szpiku kostnego (BM-MSC)	61
5.1.1.	Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z galarety Whartona (WJ-MSC)	61
5.1.2.	Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z krwi pępowinowej (UCB-MSC)	63
5.1.3.	Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego (BM-MSC).....	66
5.2.	Mezodermalne różnicowanie MSC w adipocyty, chondrocyty i osteocyty	69
5.3.	Analiza wzrostu i starzenia komórek MSC hodowanych w warunkach standardowych atmosferycznego stężenia tlenu (porównanie BM-MSC z WJ-MSC)	70
5.4.	Analiza spontanicznego różnicowania proneuralnego w populacji komórek MSC (WJ i BM) w standardowych warunkach hodowli <i>in vitro</i>	75
5.5.	Aktywność transkrypcyjna komórek MSC dla genów wybranych czynników neurotroficznycych i specyficznych dla nich receptorów w standardowych warunkach hodowli <i>in vitro</i>	78
5.6.	Wpływ obniżonego do 5% stężenia tlenu w środowisku na hodowlę komórek mezenchymalnych	81
5.6.1.	Wpływ hodowli w atmosferze obniżonego do 5% stężeniu tlenu na fenotyp komórek WJ-MSC _{NT} 82	
5.6.2.	Wpływ obniżonego stężenia tlenu na tempo proliferacji komórek WJ MSC _{NT}	83
5.6.3.	Brak spontanicznego różnicowania neuralnego w WJ-MSC _{NT}	86
5.6.4.	Indukcja ekspresji genów HIF w komórkach WJ-MSC _{NT}	87
5.6.5.	Indukcja ekspresji genów pluripotencjalnych w komórkach WJ MSC _{NT}	88
5.6.6.	Wpływ TSA na proliferację WJ-MSC _{NT}	89
5.6.7.	Indukcja różnicowania neuralnego w komórkach WJ-MSC _{NT}	90
5.6.8.	Analiza kariotypu komórek WJ-MSC _{NT} po ich długotrwałej hodowli w warunkach obniżonego do 5% stężenia tlenu.....	92
5.7.	Wpływ obniżonego stężenia tlenu 5% na komórki BM-MSC_{NT}.....	93
6.	DYSKUSJA	96
6.1.	Izolacja i optymalizacja warunków hodowli <i>in vitro</i> mezenchymalnych komórek macierzystych	96
6.2.	Analiza porównawcza wzrostu i morfologii MSC pochodzących z tkanki dojrzałej i tkanki popłodowej w warunkach standardowych <i>in vitro</i>.	101
6.3.	Ocena potencjału neurogenego otrzymanych populacji komórek meznchymalnych pochodzących z tkanki popłodowej oraz dorosłej	105
6.4.	Analiza porównawcza reakcji obu badanych typów komórek MSC na obniżone warunki stężenia tlenu w hodowli	107
6.5.	Indukowane różnicowanie neuralne WJ-MSC (mezenchymalnych komórkach macierzystych z galarety Whartona) hodowanych w obniżonym stężeniu tlenu	110
6.6.	Parakryne funkcje komórek MSC i możliwość wykorzystania czynników neurotroficznycych w terapii schorzeń neurodegeneracyjnych	111

6.7. Implikacje kliniczne przeprowadzonych badań.....	113
7. <i>PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI</i>	114
8. <i>STRESZCZENIE</i>	116
9. <i>ABSTRACT</i>	120
10. <i>SPIS PIŚMIENICTWA</i>	122
 <i>SPIS TABEL</i>	 139

WYKAZ SKRÓTÓW

- AAS** - (ang. *Antibiotic Antimycotic Solution*) - zestaw antybiotyków i preparatów przeciwgrzybiczych do hodowli komórek
- ACTB** - (ang. *Beta-Actin*) – beta-aktyna, białko konstytutywne
- AD** - (ang. *Alzheimer Disease*) - choroba Alzheimera
- ADSC** - (ang. *Adipose Derived Stem Cells*) - komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej
- α SMA** - (ang. *Alpha-Smooth Muscle Actin*) - aktyna mięśni gładkich
- AT-MSC** - (ang. *Adipose-tissue-derived Mesenchymal Stem Cells*) - mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej
- ALS** - (ang. *Amyotrophic Lateral Sclerosis*) - stwardnienie zanikowe boczne
- ANOVA** - (ang. *Analysis of variance*) - analiza wariancji
- B27** - suplement do pożywki
- BDNF** - (ang. *Brain Derived Neurotrophic Factor*) - neurotropowy czynnik wzrostu pochodzenia mózgowego
- bFGF** - (ang. *Basic Fibroblast Growth Factor*) - zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
- BM-MSC** - (ang. *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*) - mezenchymalne komórki macierzyste pochodzenia szpikowego
- BM-MSC_{NT}** - Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego hodowane w warunkach obniżonego do 5% stężenia tlenu
- BSA** - (ang. *Bovine Serum Albumine*) - albumina surowicy bydlęcej
- cAMP** - (ang. *cyclic Adenosine 3', 5'-Monophosphate*) - cykliczny adenozylo-3',5'-monofosforan
- dBcAMP** - (ang. *Dibutyryl cyclic Adenozylo Mono Phosphoran*) - dwumaślan cyklicznego AMP, drugorzędowy przekaźnik sygnału wewnątrzkomórkowego
- DMEM/F12** - (ang. *Dulbecco/Vogt Modified Eagle's Minimal Essential Medium*) - pożywka hodowlana
- c-MYC** - (ang. *Myelocytomatosis Oncogene*) - komórkowy protoonkogen, czynnik reprogramujący
- CpG** - cytozyny leżące w sąsiedztwie guanozyny, sekwencje DNA bogate w dublety CpG tworzą „wyspy CpG” w regionach promotorowych genów.
- CD** - (ang. *Cluster of Differentiation*) - antygeny różnicowania komórkowego
- CD14** - (ang. *Cluster of Differentiation 14*) - antygen obecny na makrofagach
- CD11b** - (ang. *Cluster of Differentiation 11b*) - Integryna alpha M (ITGAM), podjednostka tworząca receptor zwany macrophage-1 antigen (Mac-1) obecny na większości leukocytów
- CD19** - (ang. *Cluster of Differentiation 19*) - białko powierzchniowe obecne na komórkach B oraz leukocytach

- CD79 α** - (ang. *Cluster of Differentiation 79 α*) - B-cell antigen receptor complex-associated protein alpha chain, podjednostka wchodząca w skład receptora BCR (B-cell antigen receptor) obecnego na limfocytach B
- CD34** - (ang. *Cluster of Differentiation 34*) - białko powierzchniowe występujące na hematopoetycznych komórkach macierzystych
- CD45** - (ang. *Cluster of Differentiation 45*) - glikoproteina, białko charakteryzujące wszystkie komórki hematopoetyczne
- CD105** - (ang. *Cluster of Differentiation 105*) endogлина - białko powierzchniowe wchodzące w skład receptora TGF beta
- CD146** - (ang. *Cluster of Differentiation 146*) - melanoma cell adhesion molecule (MCAM) – białko powierzchniowe, marker charakteryzujący komórki z linii endotelialnej
- CD271** - (LNGFR) (ang. *low-affinity nerve growth factor receptor*) synonim NGFR (p75); p75NGFR; p75NTR; TNFRSF1
- CNTF** - (ang. *Ciliary Neurotrophic Factor*) - rzęskowy czynnik neurotroficzny
- CFU-F** - (ang. *Colony forming unit-fibroblast*) - jednostki tworzące kolonie fibroblastów
- CREB** - (ang. *cAMP Response Element-binding Protein, protein CREB*) - czynnik transkrypcyjny, reguluje ekspresję genów zależnych od cAMP
- CSC** - (ang. *Cancer Stem Cells*) - nowotworowe komórki macierzyste
- CXCR-4** - (ang. *CXC chemokine receptor type-4*) - receptor dla chemokin z rodziny CXC
- DMEM** - (ang. *Dulbecco/Vogt Modified Eagle's Minimal Essential Medium*) - pożywka hodowlana
- DMSO** - (ang. *Dimethyl Sulfoxide*) - dimetylo sulfotlenek
- dNTP** - (ang. *Deoxyribonucleotide*) - deoksyrybonukleotydy
- EGF** - (ang. *Epidermal Growth Factor*) - nabłonkowy czynnik wzrostu
- EMT** - (ang. *Epithelial-Mesenchymal Transition*) - przejście mezenchymalno-epitelialne
- ERK** - (ang. *Extracellular signal-Regulated Kinases*) - kinaza białkowa
- ESC** - (ang. *Embryonic Stem Cells*) - zarodkowe komórki macierzyste
- FACS** - (ang. *Fluorescence-Activated Cell Sorter*) - cytofluorometr przepływowy
- FBS** - (ang. *Fetal Bovine Serum*) - bydlęca surowica płodowa
- FIH** - (ang. *Factor Inhibiting HIF*) - hydroksylaza asparaginowa - czynnik hamujący HIF-1
- FITC** - (ang. *fluorescein isothiocyanate*) - izotiocyjanian fluoresceiny -fluorochrom
- GAPDH** - dehydrogenaza aldehydu 3 - fosfoglicerynowego - białko metabolizmu podstawowego
- GDNF** - (ang. *Glial Cell line-Derived Neurotrophic Factor*) - czynnik wzrostu pochodzenia glejowego
- GFAP** - (ang. *Glia Fibrillary Acidic Protein*) - glejowe kwaśne białko włókienkowe, białko strukturalne, specyficzne dla astrocytów
- GFR α** - (ang. *Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Receptor*) - receptor dla czynników pochodzenia glejowego

- GVHD** - (ang. *Graft-Versus-Host Disease*) - choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi
- HAT** - (ang. *Histone Acetyl Transferase*) - acetylotransferaza histonów
- HDAC** - (ang. *Histone Deacetylases*) - deacetylaza histonów
- HDACi** - (ang. *Histone Deacetylases inhibitors*) - inhibitory deacetylaz histonów
- HGF** - (ang. *Hepatocyte Growth Factor*) - czynnik wzrostowy hepatocytów
- HLA** - (ang. *human leukocyte antigens*) - ludzkie antygeny leukocytarne
- HSC** - (ang. *Hematopoietic Stem Cells*) - hematopoetyczne komórki macierzyste
- HIF-1 α** - (ang. *Hypoxia Inducible Factor 1 α*) - czynnik indukowany hipoksją 1
- HIF-2 α** - (ang. *Hypoxia Inducible Factor 2 α*) - czynnik indukowany hipoksją 2, synonim EPAS1
- HIF-3 α** - (ang. *Hypoxia Inducible Factor 3 α*) - czynnik indukowany hipoksją 3 synonim IPAS - ang. Inhibitory PAS Protein
- HRE** - (ang. *Hypoxia Response Element*) - element odpowiedzi na hipoksję
- hTERT** - (ang. *Telomerase Reverse Transcriptase*) - odwrotna transkryptaza ludzkiej telomerazy
- IBMX** - 3-izobutyl 1 metyloksantyny
- ICC** - (ang. *Immuocytochemistry*) - Immunocytochemia
- IGF** - (ang. *Insulin Growth Factor*) - insulinopodobny czynnik wzrostu
- IP3** - (ang. *Inositol-1,4,5 Triphosphate*) - inozytolo-1,4,5-trifosforan
- iPS** - (ang. *Induced Pluripotent Stem Cells*) - indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste
- ISCT** - (ang. *International Society for Cellular Therapy*) - Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej
- ITS** - (ang. *Insulin, Transferin Selenium*) - suplement pożywki hodowlanej zawierający insulinę, transferynę i selenian
- Ki-67** - (ang. *antigen Ki-67*) antygen Ki-67 - marker proliferacji komórkowej
- MACS** - (ang. *Magnetic - Activated Cell Sorting*) - metoda immunomagnetyczna sortowania komórek
- MAP2** - (ang. *Microtubule Associated Protein 2*) - białko stabilizujące mikrotubule
- MAPK** - (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase*) - kinaza białkowa aktywowana mitogenami
- MHC** - (ang. *Major Histocompatibility Complex*) - główny układ zgodności tkankowej
- MNC** - (ang. *Mononuclear Cells*) - komórki jednojądrzaste
- MSC** - (ang. *Mesenchymal Stem Cells*) - mezenchymalne komórki macierzyste
- MSCA-1** - (ang. *Mesenchymal Stem Cell Antigen-1*) - antygen obecny na komórkach mezenchymalnych
- NeuN** - (ang. *Neuronal Nuclei Antygen*) - białko jądrowe specyficzne dla dojrzałych neuronów
- NGF** - (ang. *Nerve Growth Factor*) - czynnik wzrostu nerwów
- NF200** - (ang. *200 kDa Neurofilament protein*) - neurofilament ciężki o masie molekularnej 200kDa
- NSE** - (ang. *Neuronal Specific Enolase*) - enolaza neuronowa
- NSC** - (ang. *Neural Stem Cell*) - neuralne komórki macierzyste

- NCSC** - (ang. *Neural Crest-derived Stem Cells*) - komórki macierzyste pochodzące z grzebienia nerwowego
- NT3** - (ang. *Neurotrophin*) - neurotrofina 3
- Nurr1** - (ang. *Nuclear receptor related 1 protein*) - receptor jądrowy związany z białkiem 1
- Oct3/4** - (ang. *Octamer-Binding Transcription Factor 3*) - czynnik transkrypcyjny OCT4, kluczowy dla pluripotencjalności, synonim OCT3/4
- OUN** - Ośrodkowy Układ Nerwowy
- PAS** - (*Per-AHR-ARNT-Sim*) - domena białkowa występująca w czynnikach HIF odpowiedzialna za ich heterodimeryzację
- PBS** - (ang. *Phosphate Buffered Saline*) - roztwór soli fizjologicznej w buforze fosforanowym
- PCR** - (ang. *Polymerase Chain Reaction*) - reakcja łańcuchowa polimerazy
- PDE** - (ang. *phosphodiesterase*) - fosfodiesteraza
- PDT** - (ang. *Population Doubling Time*) - czas podwajania populacji komórek
- PFA** - (ang. *ParaFormAldehyde*) - paraformaldehyd
- PHD** - (ang. *Prolyl hHydroxylase Domain*) - hydroksylaza prolinowa
- PI3K** - (ang. *Phosphatidylinositol 3-Kinase*) - kinaza 3-fosfatydyloinozytolu
- PKC** - (ang. *Protein Kinase*) - kinaza białkowa C
- PLC** - (ang. *Phospholipase C*) - fosfolipaza C
- RA** - (ang. *all-trans Retinoic Acid*) - kwas retinowy
- Rex1** - (ang. *RNA exonuclease 1*) - czynnik transkrypcyjny typu „zinc finger”
- ROS** - (ang. *Reactive Oxygen Species*) - reaktywne formy tlenu
- RT** - (ang. *Reverse Transcription*) - reakcja odwrotnej transkrypcji
- SDF-1** - (ang. *Stromal-Derived Factor 1*) - czynnik pochodzenia stromalnego 1
- SIRT** - (ang. *Sir-two-ins, Silent information regulator*) - białka należące do rodziny deacetylaz
- SM** - (ang. *Sclerosis Multiplex*) - stwardnienie rozsiane
- SOX2** - (ang. *SRY-related HMG-box*) - czynnik transkrypcyjny kluczowy dla pluripotencjalności
- SSEA-4** - (ang. *Stage Specific Embryonic Antigen*) - białko powierzchniowe obecne w komórkach zarodka na wczesnych etapach rozwoju
- SRTF** - (ang. *Stemness-Related Transcription Factors*) - zestaw czynników transkrypcyjnych kluczowych dla pluripotencjalności Oct3/4, Sox2, Rex1, Nanog
- STRO-1** - (ang. *Stromal Precursor Antigen-1*) - antygen obecny na komórkach stromalnych progenitorowych
- TSA** - (ang. *Trichostatin A*) - Trichostatyna A - inhibitor deacetylazy histonów
- TRA1-60** - (ang. *Tumor Rejection Antigen*) - antygen powierzchniowy komórek pluripotencjalnych
- Trk** - (ang. *Tropomyosin-Related Kinase, Tyrosine Kinase Receptor*) - receptor o aktywności kinazy tyrozynowej

TUJ-1 - przeciwciało przeciwko β -tubulinie III (ang. *Neuron-specific class III beta-tubulin*), marker neuronów

UCB-MSC - (ang. *Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells*) - mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z krwi pępowinowej

WJ - (ang. *Wharton Jelly*) - galareta Whartona

WJ-MSC - (ang. *Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells*) - mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z galarety Whartona

WJ-MSC_{NT} - Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z galarety Whartona hodowane w warunkach obniżonego do 5% stężenia tlenu

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

VLA-4 - (ang. Integrin alpha4beta1 -Very Late Antigen-4) - integryna, cząsteczka adhezyjna

VPA - (ang. *Valproic Acid*) - kwas walproinowy

1. PRZEGLĄD LITERATURY

Odkrycie przez Friedensteina w latach 70-tych XX wieku obecności niehematopoetycznych (niekrwiotwórczych) komórek macierzystych w szpiku zwierząt zmieniło dotychczasowe poglądy na temat somatycznych komórek macierzystych (Friedenstein i wsp., 1976). Friedenstein zidentyfikował populację wrzecionowatych, kształtem zbliżonych do fibroblastów komórek, które tworzyły kolonie i nazwał je CFU-F (ang. *Colony Forming Unit - Fibroblast*). W późniejszym czasie komórki te zostały nazwane mezenchymalnymi komórkami macierzystymi MSC (ang. *Mesenchymal Stem Cells*) lub mezenchymalnymi komórkami zrębu (ang. *Mesenchymal Stromal Cells*) (Horwitz i wsp., 2005). Bogatym i dobrze poznanym źródłem MSC jest szpik kostny (Dominici i wsp., 2001; Wexler i wsp., 2003), jednak komórki o podobnej morfologii i charakterystyce można również zaobserwować w innych tkankach: w krwi pępowinowej, galarecie Whartona, łożysku, krwi obwodowej, tkance tłuszczowej, skórze oraz w specyficznych niszach występujących we wszystkich narządach (Campagnoli i wsp., 2001; da Silva Meirelles i wsp., 2006). MSC w warunkach hodowli *in vitro* przylegają do podłoża, wykazują wysoki potencjał proliferacyjny, jak również zdolność do różnicowania w kierunku komórek pochodzenia mezodermalnego: adipocytów, chondrocytów i osteoblastów. W celu uporządkowania nomenklatury komórek MSC w 2006 roku Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej (*ISCT*, ang: *International Society for Cellular Therapy*) podjęło próbę wyznaczenia podstawowych kryteriów w ich identyfikacji. W powstałej klasyfikacji MSC muszą, oprócz przylegania do podłoża i zdolności do różnicowania w kierunku komórek mezodermy, wykazywać obecność antygenów powierzchniowych uznanych jako specyficzne dla tej populacji: CD105 (endoglina), CD73, CD90 oraz brak na powierzchni antygenów komórek hematopoetycznych CD34, CD45, CD14 oraz CD11b, CD79a, CD19 i antygenów HLA klasy II (Dominici i wsp., 2006). Obecnie powstało wiele kontrowersji dotyczących potencjału funkcjonalnego komórek MSC, jak również nazewnictwa i ustalonej klasyfikacji. W miarę postępu wiedzy niektórzy badacze uważają, że kryteria wyznaczone w 2006 przez ISCT na podstawie aktualnych danych literaturowych powinny zostać ponownie zweryfikowane (Lv i wsp., 2014). Duże podobieństwo do fibroblastów w wyglądzie i sposobie wzrostu oraz brak różnic w występowaniu markerów powierzchniowych swoistych tylko dla MSC, doprowadziło do powstania wątpliwości i trudności w identyfikacji „prawdziwych MSC” (Kundrotas i wsp., 2012; Halfon i wsp., 2011; Lupatov i wsp., 2015). Paolo Bianco i grupa współautorów skrytykowali definicję i koncepcję mezenchymalnych komórek zrębu jako „komórek leczniczych” lub „komórek macierzystych” (definicja Caplana z 1991) (Bianco i wsp., 2013). Autorzy doniesienia sądzą, że minimalne kryteria zaproponowane przez ISCT do identyfikacji komórek MSC są niewystarczające. Nie

do końca wyjaśniona jest również kwestia „macierzystości” MSC, ponieważ nie wszystkie wyizolowane komórki tej grupy wykazują takie same zdolności do samoodnowy i trzykierunkowego różnicowania. Co ciekawe wykazano, że fibroblasty ze skóry mogą również wykazywać pewne zdolności do różnicowania oraz inne cechy podobne do komórek MSC (Lorenz i wsp., 2008; Junker i wsp., 2010).

Uważa się, że MSC stanowią heterogenną populację komórek różniących się potencjałem proliferacyjnym i zdolnością do różnicowania w zależności od lokalizacji tkankowej. Wykazano, że MSC pochodzące ze szpiku kostnego wydajniej różnicują się w tkanki kostne i chrzęstne w porównaniu z komórkami mezenchymalnymi z tkanki tłuszczowej ADSC (ang. *Adipose Derived Stem Cells*) (Im i wsp., 2005; Pevsner-Fischer i wsp., 2011). Niektórzy badacze uważają, że pod kątem zastosowań w medycynie regeneracyjnej, populacje MSC powinny zostać wyodrębnione i rozpatrywane w zależności od źródła. Obecnie wykazano także, że w populacji MSC, tylko pewna część komórek spełnia kryteria „macierzystości”, podczas gdy pozostałe komórki mogą spełniać funkcję pomocnicze lub są to komórki zdolne do różnicowania tylko w jednym kierunku (Siegel i wsp., 2013). W świetle ostatnich badań, oprócz ustanowionych przez ISCT podstawowych markerów MSC, zaproponowano dodatkowe markery precyzyjniej charakteryzujące macierzysty charakter komórek: SSEA-4 (ang. *Stage Specific Embryonic Antigen-4*), STRO-1 (ang. *Stromal Precursor Antigen-1*), CD271, CD146, CD497, CD349 oraz MSCA-1 (ang. *Mesenchymal Stem Cell Antigen-1*) (Lv i wsp., 2014; Alvarez-Viejo i wsp., 2015). SSEA-4 jest antygenem powierzchniowym silnie wyrażonym na zarodkowych komórkach macierzystych oraz niektórych frakcjach komórek MSC o mniej zróżnicowanym fenotypie (Lanctot i wsp., 2007; Suila i wsp., 2011). Porównując populacje komórek wyizolowanych ze szpiku kostnego, komórki pozytywne pod względem SSEA-4 (+) wykazywały trzykierunkowe różnicowanie oraz wysokie tempo wzrostu, natomiast nie zaobserwowano tych właściwości w wyodrębnionej frakcji SSEA-4 (-) negatywnej (Gang i wsp., 2007; Battula i wsp., 2007). Jednak do tej pory wciąż jednoznacznie nie ustalono czy SSEA-4 jest wiarygodnym markerem w typowaniu multipotencjalnych funkcji MSC. Istnieją wyniki sugerujące brak antygenu SSEA-4 w mezenchymalnych komórkach macierzystych oraz możliwość uzyskania fałszywie pozytywnych wyników obecności białka SSEA-4 w trakcie hodowli *in vitro*. Obserwowano wysoką pozytywną reakcję na ten antygen w wyniku ekspozycji na płodową surowicę cielęcą (FCS, ang. *Fetal Calf Serum*), która jest często stosowana do hodowli komórek i może zawierać glikosfingolipidy, niespecyficznym rozpoznawane przez przeciwciała anti-SSEA-4 (He i wsp., 2014).

Ponadto istnieją dane sugerujące, że w populacji MSC może być zawarta również pula dużo mniej zaawansowanych w rozwoju i niedojrzałych komórek, które charakteryzują się ekspresją pluripotencjalnych czynników transkrypcyjnych tj. Oct-4, Sox2 i Nanog i są podobne

do zarodkowych komórek macierzystych (ESC, ang. *Embryonic Stem Cell*) (Kuroda i wsp., 2010, Nekanti i wsp., 2010; Tantrawatpan i wsp., 2013; Ogura i wsp., 2014). Doniesienia na temat właściwości pluripotencjalnych komórek MSC nie zostały w pełni wyjaśnione.

1.1. Źródła mezenchymalnych komórek macierzystych

Wyniki badań ostatnich kilku lat ujawniły możliwość otrzymania różnorodnych komórek macierzystych z tkanek płodowych lub dojrzałego organizmu tzw. „dorosłych” komórek macierzystych, nazwanych również somatycznymi komórkami macierzystymi. Jak dotąd najlepiej poznanym i zidentyfikowanym źródłem komórek macierzystych jest szpik kostny. Jest on zasiedlony nie tylko przez frakcję hematopoetycznych komórek macierzystych (HSC, ang: *Hematopoietic Stem Cells*), ale również przez mezenchymalne komórki macierzyste. Wykazano, że na 10^5 wszystkich komórek jednojądrzastych przypada około 1-4 komórek MSC (Pittenger i wsp., 1999). Najwięcej MSC występuje w szpiku noworodków, następnie obserwowany jest znaczny spadek ich liczby wraz z wiekiem (D'Ippolito i wsp. 1999; Stolzing i wsp., 2008). Metody pobierania szpiku kostnego są metodami inwazyjnymi i wymagają znieczulenia, dlatego wciąż poszukiwane są alternatywne źródła komórek MSC, mogące znaleźć zastosowanie w medycynie regeneracyjnej. W ostatnich latach dość popularnym źródłem do pozyskania komórek MSC okazała się tkanka tłuszczowa, a komórki w niej występujące nazwano ADSC (ang. *Adipose Derived Stem Cells*). Uważa się, że procedura pobierania tkanki tłuszczowej metodą odsysania tłuszczu jest mniej inwazyjna niż w przypadku aspiracji szpiku kostnego. Małe ilości tkanki tłuszczowej (50 ml - 100 ml) mogą zostać pobrane podczas znieczulenia miejscowego. Wykazano, że częstość występowania komórek MSC w tkance tłuszczowej jest dużo większa niż w szpiku kostnym a 1g tkanki tłuszczowej zawiera 500x więcej tych komórek niż 1g szpiku kostnego (Kitagawa i wsp., 2006; Fraser i wsp., 2006). Komórki z tkanki tłuszczowej mają wysoką zdolność do proliferacji i wielokierunkowego różnicowania w ramach mezodermalnego listka zarodkowego, co sprawia, że są korzystnym źródłem do przeszczepów komórek na potrzeby medycyny regeneracyjnej i estetycznej. Opierając się na ostatnich doniesieniach wykazano, że ze względu na częstość występowania komórek MSC oraz ograniczenia wynikające z ilości materiału możliwego do pobrania, tkanka tłuszczowa jest lepszym źródłem komórek terapeutycznych niż szpik kostny (Fujimura i wsp., 2009).

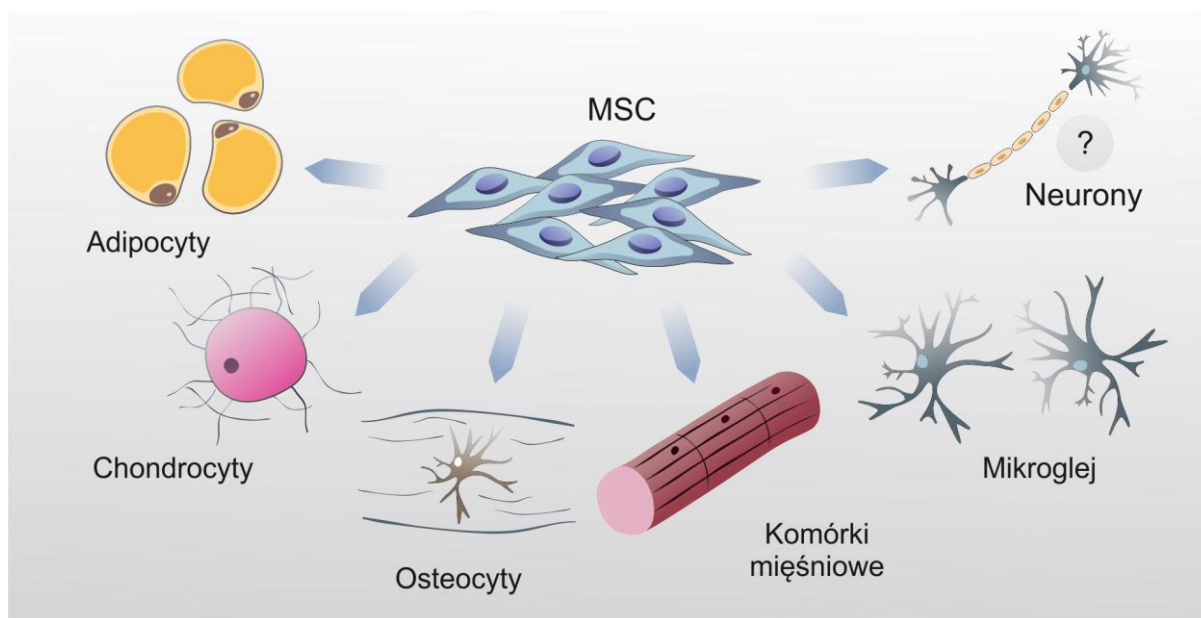
Coraz częściej badanym i wykorzystywanym w układzie auto-, jak i allogenicznym źródłem mezenchymalnych komórek macierzystych są tkanki pozostałe po porodzie tzw. tkanki popłodu (krew pępowinowa, sznur pępowinowy, łożysko, błony płodowe oraz płyn owodniowy). Pozyskiwanie materiału z tych źródeł nie wiąże się ze skomplikowanymi

zabiegami chirurgicznymi, jak w przypadku pobierania komórek ze szpiku kostnego czy tkanki tłuszczowej. Wydaje się, że w porównaniu z MSC pochodzącymi z dorosłych tkanek ze szpiku lub tkanki tłuszczowej, komórki MSC wyizolowane z tkanek znajdujących się w okresie okołoporodowym są bardziej pierwotne i mniej ukierunkowane (Moretti i wsp., 2010; Lindenmair i wsp., 2012). Istnieją badania wskazujące, że MSC z tkanek płodu mogą różnicować się nawet do komórek pochodzących ze wszystkich trzech listków zarodkowych, co świadczy o ich większym potencjale, a więc o pluripotencjalności (Guillot i wsp., 2007). Pozyskiwanie komórek z tkanek popłodowych jest jednak ograniczone czasowo do okresu okołoporodowego i wiąże się z koniecznością natychmiastowej izolacji komórek bądź zamrażaniem tkanek w biobankach. Procedura pozyskiwania komórek MSC z zamrożonych depozytów krwi pępowinowej czy sznura pępowinowego ciągle nie jest efektywna. Ponadto uważa się, że krew pępowinowa jest stosunkowo mało korzystnym źródłem do pozyskania komórek MSC, przeciwieństwo do bogatej frakcji innych komórek jednojądrzastych (MNC, ang. *Mononuclear Cells*). Natomiast cennym źródłem mezenchymalnych komórek macierzystych okazała się tkanka galarety Whartona sznura pępowinowego (WJ, ang. *Wharton Jelly*). Procedura pobierania WJ-MSK jest technicznie prostsza i w wydajny sposób można wyizolować bogatą populację popłodowych komórek MSC (Batsali i wsp., 2013; Nagamura-Inoue i wsp., 2014). Z danych wynika, że galareta Whartona zawiera dużo więcej komórek MSC w porównaniu z krwią pępowinową (Zeddou i wsp., 2010; Pelosi i wsp., 2012).

1.2. Neuralny potencjał komórek MSC

Jak już wspomniano, MSC mogą różnicować się w komórki tkanek wywodzących się z mezodermy takich jak adipocyty, osteocyty i chondrocyty (ryc. 1). Jedną ze szczególnych cech komórek MSC opisywaną przez niektórych badaczy jest zdolność do „przeróżnicowania” w warunkach hodowli *in vitro* w komórki innej linii lub nawet innego listka zarodkowego (Woodbury i wsp., 2000; Ullah i wsp., 2013). Istnieje szereg doniesień potwierdzających różnicowanie MSC w komórki mięśni szkieletowych, mięśni gładkich, hepatocytów, komórek wysp Langerhansa oraz komórek ośrodkowego układu nerwowego (Bae i wsp., 2011; Claros i wsp. 2012; Ferroni i wsp., 2013; Ji i wsp. 2012; Ribeiro i wsp., 2013). Odkrycie potencjalnych zdolności do różnicowania neuronalnego niehematopoetycznych komórek macierzystych *in vitro* rozbudziły wielkie nadzieje co do możliwości wykorzystania ich w terapii komórkowej (Bużańska i wsp., 2002; Storch i wsp., 2002). Jednocześnie fakt ten stał się przedmiotem wielu kontrowersji wyjaśnionych dopiero po latach dodatkowych badań i potwierdzeń. Szczególnie interesujące są zdolności komórek MSC do neuralnego różnicowania z uwagi na ich potencjalne zastosowania w leczeniu schorzeń neurologicznych, w których do tej pory nie ma

efektywnych metod terapii (Ribeiro i wsp., 2013). Wydaje się jednak, że większość obecnie testowanych klinicznie eksperymentalnych terapii komórkowych chorób ośrodkowego układu nerwowego OUN wymaga ciągle dalszych badań i obecnie nie mogą być uznane jako ustalone metody postępowania terapeutycznego.



Ryc. 1. Schemat wielokierunkowego różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych. MSC mogą różnicować się w komórki wywodzące się z mezodermy: adipocyty, chondrocyty, osteocyty oraz pochodzące z ektodermy komórki nerwowe. Źródło Dreła i wsp., 2013 z modyfikacjami.

Szereg artykułów przeglądowych zawiera obecnie informacje dotyczące różnicowania neuralnego komórek MSC pochodzących z różnych źródeł w warunkach *in vitro* (Taran i wsp., 2014; Trzaska i wsp., 2007, Tatard i wsp., 2007). W opisywanych pracach przeważa pogląd sugerujący, że MSC, pochodzące z tkanek niedojrzałych ze względu na swoje właściwości plastyczne, efektywniej mogą różnicować się w komórki o fenotypach neuralnych, wykazując łącznie obecność typowych liniowych markerów (Balasubramanian i wsp., 2013). We wcześniejszej pracy zespołu Tondreau wykazano również, że niektóre populacje MSC wyizolowane ze szpiku kostnego będące na wczesnych etapach hodowli wykazują spontaniczną ekspresję wczesnych markerów neuralnych tj. nestyny (progenitory neuralne) i TUJ-1 (neuroblasty) a w dalszych etapach hodowli (4-5 pasaż) nabywają markerów dojrzałych neuronów MAP2 (ang. *Microtubule Associated Protein 2*) i astrocytów GFAP (ang. *Glia Fibrillary Acid Protein*) (Tondreau i wsp., 2004). Pozytywne wyniki różnicowania neuralnego komórek MSC *in vitro* otrzymano w doświadczeniach z zastosowaniem określonych związków chemicznych, czynników wzrostu, współ-hodowli z dojrzałymi neuronami lub z zastosowaniem hodowli trójwymiarowych agregatów (tzw. neurosfer) (Fu i wsp., 2008; Yang i wsp., 2015). W

badaniach eksperymentalnych, przeprowadzonych na zwierzętach transgenicznym będących modelami chorób o podłożu neurologicznym, zaobserwowano znaczną poprawę funkcjonalną po przeszczepieniu komórek MSC (Wakabayashi i wsp., 2010). Zastosowanie tych komórek może być powiązane z ich bezpośrednim działaniem czyli zastępowaniem uszkodzonych komórek w wyniku różnicowania neuralnego lub z oddziaływaniem pośrednim wpływającym korzystnie na endogenne procesy regeneracyjne organizmu. Mechanizm działania i zakres plastyczności komórek MSC w warunkach *in vivo* do dziś nie są wyjaśnione i ciągle budzą ogromne kontrowersje wśród badaczy. Postulowane przeróżnicowanie obejmowałoby szereg zmian fenotypowych związanych ze zmianą profilu ekspresji genów, a co za tym idzie zmianami morfologicznymi i czynnościowymi tych komórek. Nie wiadomo czy do przeróżnicowania (ang. *transdifferentiation*) konieczne jest wcześniejsze odróżnicowanie komórki. Z powodu braku markerów, charakteryzujących poszczególne stadia rozwojowe komórek MSC czy aktualny stopień ich zróżnicowania *in vitro*, trudno jest poznać prawidłowości tego procesu. Badania przedkliniczne na zwierzętach potwierdzają właściwości neuroprotektoryjne przeszczepów komórek MSC, co można łączyć z produkcją przez nie licznych, ważnych dla neuronów czynników wzrostowych, przeciwzapalnych i antyapoptotycznych (Gornicka-Pawlak i wsp., 2011, 2015; Jabłońska i wsp., 2010). Uszkodzeniom tkanki często towarzyszy stan zapalny, a produkowane lokalnie czynniki zapalne mobilizują komórki MSC do miejsc uszkodzenia. Uważa się, że MSC oprócz funkcji naprawy tkanek w odpowiedzi na proces zapalny mogą korzystnie modulować mikrośrodowisko. Badania przedkliniczne wykazały, że MSC pochodzące z różnych źródeł mają dużą zdolność modulowania odpowiedzi immunologicznej, co skłania do ich zastosowań klinicznych, zwłaszcza w chorobach o podłożu zapalnym czy autoagresywnym (Hoogduijn i wsp., 2010). Jednym z postulowanych mechanizmów oddziaływań MSC poza produkcją czynników parakrynych o oddziaływaniach regeneracyjnych może być komunikacja pomiędzy komórkami za pomocą wydzielanych przez komórki MSC tzw. mikropęcherzyków. Mikropęcherzyki zawierają substancje, których skład i rola w dużej mierze zależą od właściwości komórek, z których pierwotnie pochodzą. Mikropęcherzyki produkowane przez komórki MSC mogą być nośnikami potencjalnie terapeutycznie bioaktywnych cząsteczek, takich jak: białka, lipidy i kwasy nukleinowe, które odgrywają istotną rolę w procesie regeneracji (Biancone i wsp., 2012; Sabin i wsp., 2014). W licznych badaniach przedklinicznych stwierdzono, że zdolność MSC do uwalniania mikropęcherzyków koreluje pozytywnie ze stymulacją endogennej neurogenezy oraz zwiększeniem regeneracji tkanek (Chen i wsp., 2015; Raisi i wsp., 2014; Lai i wsp., 2012).

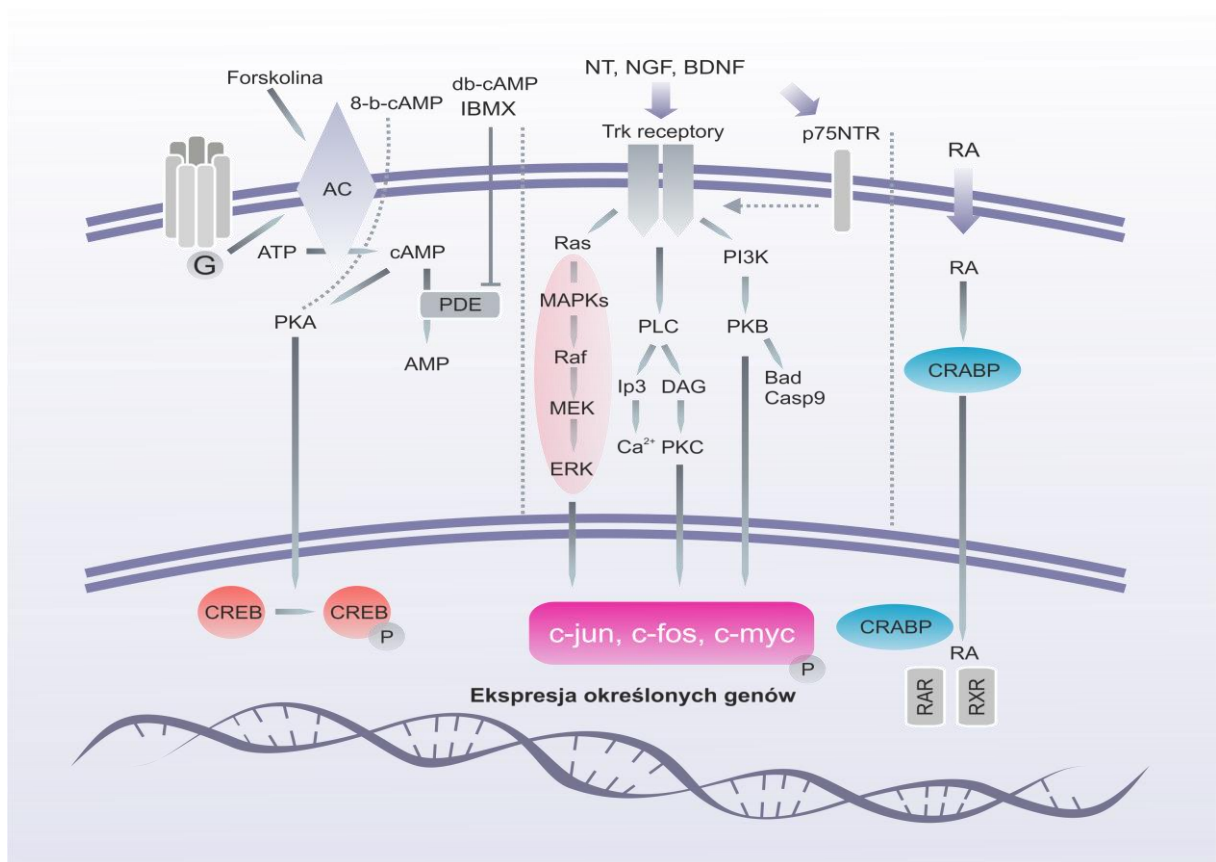
1.3. Mechanizmy i ścieżki sygnałowe związane z różnicowaniem neuralnym MSC

Wyniki badań prowadzonych w laboratoriach na całym świecie wykazały, że poszczególne populacje MSC w warunkach *in vitro* różnicują się do komórek neuronalnych poprzez aktywację odpowiednich wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych pod wpływem różnych czynników indukujących. Opisane doświadczenia dotyczyły zastosowania swoistych czynników wzrostu lub cytokin, związków chemicznych o właściwościach różnicujących lub czynników transkrypcyjnych. Obserwowano zmiany morfologii i fenotypu MSC wraz z modulacją i aktywacją ekspresji odpowiednich genów charakterystycznych dla komórek z linii neuralnej. Powodzenie procesu różnicowania neuralnego komórek MSC uzyskano również metodami transfekcji określonym materiałem genetycznym m.in. czynnikiem pochodzenia mózgowego BDNF (ang: *Brain Derived Neurotrophic Factor*) oraz innymi genami (Liu i wsp., 2015; Yan i wsp., 2013). Wykazano również znaczenie związków takich jak DMSO (ang. Dimethyl Sulfoxide), którego dodanie do hodowli powodowało indukcję komórek o fenotypach neuropodobnych (Woodbury i wsp. 2000; Li i wsp., 2010, Mareschi i wsp., 2006). W poniższych rozdziałach pracy omówiono główne ścieżki sygnalizacyjne odgrywające kluczową rolę w skierowaniu mezenchymalnych komórek macierzystych na drogę różnicowania neuralnego. Tabela 1 umieszczona na końcu rozdziału przedstawia podsumowanie wykorzystanych protokołów z uwzględnieniem poszczególnych czynników i rodzaju zastosowanych komórek MSC.

1.3.1. Udział szlaku sygnałowego cAMP w różnicowaniu komórek MSC

Powszechnie stosowanym czynnikiem, wykorzystywanym w protokołach w inicjacji różnicowania neuralnego, jest cykliczny adenozylo-3',5'-cAMP. Ścieżka sygnałowa zależna od cAMP odgrywa fundamentalną rolę w rozwoju zarodkowym, a w OUN decyduje o przeżyciu komórek nerwowych i o wielu procesach związanych z podstawowymi jak i wyższymi funkcjami mózgu takimi jak pamięć długoterminowa oraz właściwości plastyczne komórek nerwowych (Mantamadiotis i wsp., 2002; Kandel i wsp. 2012; Josselyn i wsp., 2005). Chociaż mechanizm działania szlaku cAMP w różnicowaniu neuralnym komórek MSC nie do końca został poznany, wielu badaczy sugeruje jego niepodważalny udział w tych procesach. W protokołach różnicowania neuralnego cAMP jest często stosowany zamiennie z innymi cząsteczkami, które powodują podniesienie poziomu wewnątrzkomórkowego cAMP. Jedną z nich jest forskolina, która może bezpośrednio aktywować cyklazę adenylanową i prowadzić do syntezy cAMP lub dibutyryl-cAMP (db-cAMP) działający jako analog cAMP przechodzący do wnętrza komórki. Kolejny stosowany związek 3-izobutyl 1 metyloksantyny

(IBMX) działa jako inhibitor fosfodiesterazy (PDE), tym samym zapobiega rozkładowi cAMP do AMP. Powstający w cytoplazmie cAMP jest wtórnym przekaźnikiem informacji, odpowiadającym na pobudzenie receptorów błonowych związanych z białkami G. W wyniku aktywacji cyklazy adenylanowej wzrasta poziom cAMP, który następnie aktywuje kinazę białkową A (PKA) wywołując dalsze reakcje w komórce. W przypadku różnicowania neuralnego aktywna kinaza A decyduje o poziomie fosforylacji w jądrze komórkowym czynników transkrypcyjnych zależnych od cAMP tzw. białek CREB (ang. *cAMP response element binding protein, protein CREB*) (ryc. 2). W wyniku fosforylacji białek CREB w rejonach promotorowych dochodzi do aktywacji transkrypcji docelowych genów, w tym przypadku związanych z procesem różnicowania neuralnego.



Ryc. 2. Schemat głównych ścieżek sygnałowych odgrywających kluczową rolę w różnicowaniu neuralnym komórek MSC. Ścieżki sygnałowe indukowane różnymi czynnikami: zależna od cAMP, kwasu RA i Neurotrofin. Zastosowane skróty: AC (cyklaza adenylanowa), cAMP (cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan), (PKA (Kinaza A), PDE (fosfodiesteraza), PLC (fosfolipaza C), RA (kwas retinowy), CREB (cAMP Response Element-binding Protein), PI3 (kinaza 3-fosfatydyloinozytolu) PKC (kinaza białkowa C) MAPK (kinazy aktywowane mitogenami).

Wyniki badań zespołu Wang'a wykazały, że aktywacja kinazy PKA może pośredniczyć w różnicowaniu neuralnym mezenchymalnych komórek macierzystych z krwi pępowinowej. Po

do dodaniu do komórek forskoliny, autorzy zaobserwowali obecność struktur neuryto-podobnych oraz markerów neuralnych m.in białka neurofilamentu, kwaśnego białka włókienkowego GFAP oraz Nurr1 (ang. *Nuclear receptor related 1 protein*). Wykazano również, że całkowite zablokowanie kinazy PKA prowadzi do braku wcześniej zaobserwowanego różnicowania neuralnego (Wang i wsp., 2007). Bezpośredni udział kinazy PKA w różnicowaniu neuralnym mezenchymalnych komórek macierzystych został potwierdzony w innych badaniach (Jori i wsp., 2005). W doświadczeniach z użyciem ludzkich MSC pochodzących ze szpiku pozytywne efekty różnicowania neuralnego wykazano z zastosowaniem IBMX w połączeniu z neurotropowym czynnikiem pochodzenia mózgowego BDNF. Potwierdzono, również niezbędny udział ścieżki PKA, ponieważ dodanie inhibitora PKA do pożywki indukcyjnej całkowicie niwelowało efekt różnicowania neuralnego (Lepski i wsp. 2010).

Na podstawie wielu opublikowanych wyników badań wydaje się, że szlak cAMP może być kluczowym elementem zaangażowanym w neuralne różnicowanie komórek MSC *in vitro*, jednak pod kątem zastosowania w klinice jego dokładna rola w tym procesie musi zostać dogłębniej zbadana. Wyniki badań Zhang pokazują, że pomimo zaobserwowanych zmian morfologii, przebudowy cytoszkieletu oraz indukcji genów neuralnych pod wpływem cAMP, komórki MSC szpiku kostnego nie osiągały pełnego funkcjonalnego zróżnicowania (Zhang i wsp., 2011). Podobne wyniki otrzymano na podstawie analizy wpływu wzrostu wewnątrzkomórkowego cAMP po dodaniu forskoliny i 8-bromo-cAMP. Badania te wykazały, że zastosowane w protokole związki wywoływały jedynie przemijający wzrost β -tubuliny III i innych markerów neuralnych, połączony ze zmianą morfologii komórek. Istnieje pogląd, że czynniki, które zwiększają stężenie cAMP mogą indukować jedynie przejściowe zmiany w ekspresji markerów neuronalnych, które wydają się być rezultatem adaptacji komórek do zmiany w warunkach hodowli zamiast rzeczywistego procesu różnicowania w kierunku neuronów (Rooney i wsp., 2009).

1.3.2. Udział szlaku indukowanego kwasem retinowym w różnicowaniu komórek MSC

Kwas retinowy (RA) odgrywa fundamentalną rolę w wielu procesach podczas rozwoju zarodkowego. Bierze udział w rozwoju mózgu, a zwłaszcza w specyfikacji przednio- tylnej osi układu nerwowego oraz regulacji ekspresji genów Hox w określonych obszarach zarodka (Maden i wsp., 2002). Niezależnie uzyskane wyniki doświadczeń z zastosowaniem RA wskazują na jego prawdopodobny udział w różnicowaniu neuralnym mezenchymalnych komórek macierzystych. W wielu pracach potwierdzono skuteczność kwasu RA, opierając się na zastosowaniu jako pojedynczego składnika w pożywkach różnicujących komórki neuralnie. Inni badacze postulowali zastosowanie RA w kombinacji z dodatkowymi czynnikami

determinującymi różnicowanie neuralne, również w tym przypadku udało się wykazać pozytywne rezultaty. Jednak szczegółowy mechanizm działania kwasu retinowego na ścieżki sygnalizacji kierujące różnicowaniem neuralnym w komórkach MSC wciąż jest słabo poznany. Badając wpływ RA na różnicowanie neuralne mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego Scintu i wsp. zaobserwowali pozytywną reakcję komórek, które po inkubacji z kwasem retinowym wykazywały obecność markerów tj. NSE (ang. *Neuronal Specific Enolase*), β -tubuliny III, GFAP i neurofilamentu 150 kDa (Scintu i wsp., 2006). W kolejnym eksperymencie z udziałem MSC szpiku kostnego szczura inkubowanych przez 24 godziny z RA, a następnie umieszczonych w wieloskładnikowej pożywce różnicującej komórki w kierunku neuralnym uzyskano znaczne zwiększenie wydajności procesu różnicowania. Okazało się, że wcześniejsza inkubacja komórek z RA miała wpływ na wzrost liczby komórek wykazujących nestynę, NSE oraz białko związane z mikrotubulami MAP2. Ponadto MSC hodowane w obecności RA na koniec procesu różnicowania wykazywały wyższe stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia (Bi i wsp., 2010). Mimo wielu pozytywnych rezultatów, potwierdzających rolę RA i szlaku z nim związanego w różnicowaniu neuralnym komórek mezenchymalnych w warunkach *in vitro*, koncepcja klinicznego zastosowania kwasu retinowego wydaje się jeszcze przedwczesna.

1.3.3. Udział szlaku sygnałowego indukowanego neurotrofinami w różnicowaniu komórek MSC

Czynniki neurotroficzne to rodzina białek, do której zaliczamy neurotrofiny tj. czynnik wzrostu nerwów (NGF, ang. *Nerve Growth Factor*), czynnik wzrostu pochodzenia mózgowego (BDNF) oraz neurotrofiny (NT, ang. *Neurotrophin*) 3, 4/5. Neurotrofiny to czynniki decydujące o rozwoju, przeżyciu i funkcji komórek w układzie nerwowym. Mogą działać poprzez dwie klasy receptorów o wysokim powinowactwie: TrkA, TrkB i TrkC (ang. *Tyrosine Kinase Receptor*), które odpowiednio są związane z NGF, BDNF/NT-4, NT-3 oraz przez aktywację wspólnego receptora o niskim powinowactwie p75^{NTR} (ang. *Low-Affinity Nerve Growth Factor Receptor*). Aktywacja receptorów prowadzi do uaktywnienia odpowiednich szlaków sygnałowych w komórkach docelowych, głównie kaskady kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (kinazy MAP, MAPK, ang. *Mitogen-Activated Protein Kinases*), szlaku fosfolipazy C (PLC) i kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K) (ryc. 2) (Huang i wsp. 2003; Reichardt i wsp., 2006). Szlak sygnałowy MAPK obejmuje szereg kinaz białkowych, których aktywacja wyzwala wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe, ostatecznie prowadzące do fosforylacji wybranych czynników transkrypcyjnych i regulacji ekspresji kluczowych genów również w różnicowaniu neuralnym. Wiadomo, że kinaza MAPK ulega ekspresji w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) i wraz z efektorową kinazą ERK (ang. *Extracellular Signal-Regulated Kinases*), bierze

udział w wielu ważnych procesach, w tym dojrzewaniu i przeżyciu neuronów i prawidłowej funkcji synaptycznej. Zespół naukowców pod kierunkiem Wislet-Gendebiena zaobserwował, że komórki MSC wyizolowane ze szpiku kostnego BM-MS (ang. *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell*) współhodowane z neuronami ziarnistymi mózdzku wykazywały zdolność do różnicowania neuralnego, uwidaczniając również markery neuralne (Wislet-Gendebien i wsp., 2005, 2012). Autorzy postulowali kluczowy udział ścieżki MAPK w procesie różnicowania neuralnego, ponieważ w obecności inhibitora tej ścieżki proces różnicowania był całkowicie zablokowany. Badania innej grupy wykazały istotną rolę BDNF w różnicowaniu neuralnym ludzkich komórek MSC izolowanych z krwi pępowinowej (UCB-MS, ang. *Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells*) jednak badacze sugerowali konieczność szczegółowego zbadania dodatkowo zaangażowanych innych ścieżek sygnałowych (Lim i wsp., 2008). Ta sama grupa autorów kilka lat później wykazała, że zmodyfikowane genetycznie komórki MSC z krwi pępowinowej w wyniku transfekcji plazmidem z genem BDNF nabywały ekspresji β -tubuliny III, NeuN (ang: *Neuronal Nuclear Antygen*), GFAP oraz zasadowego białka mieliny (MBP, ang: *Myelin Basic Protein*) (Lim i wsp., 2011). Podobnie podczas badań z zastosowaniem czynnika wzrostu BDNF obserwowano zmiany morfologii w komórkach MSC pochodzących z galarety Whartona a fenotyp neuralny komórek potwierdzono obecnością typowego dla neuronów białka MAP2 (Zhang i wsp., 2012). Zastosowanie protokołu różnicowania neuralnego opartego o zastosowanie czynnika BDNF w połączeniu z IBMX, zwiększającego poziom cAMP (Ying i wsp., 2012) na komórkach AT-MS (ang. *Adipose-tissue-derived Mesenchymal Stem Cells*) również wykazało obecność markerów neuralnych GFAP oraz β -tubuliny III. Podsumowanie protokołów różnicowania neuralnego komórek mezenchymalnych zostało przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1. Podsumowanie protokołów wykorzystywanych w różnicowaniu neuralnym MSC

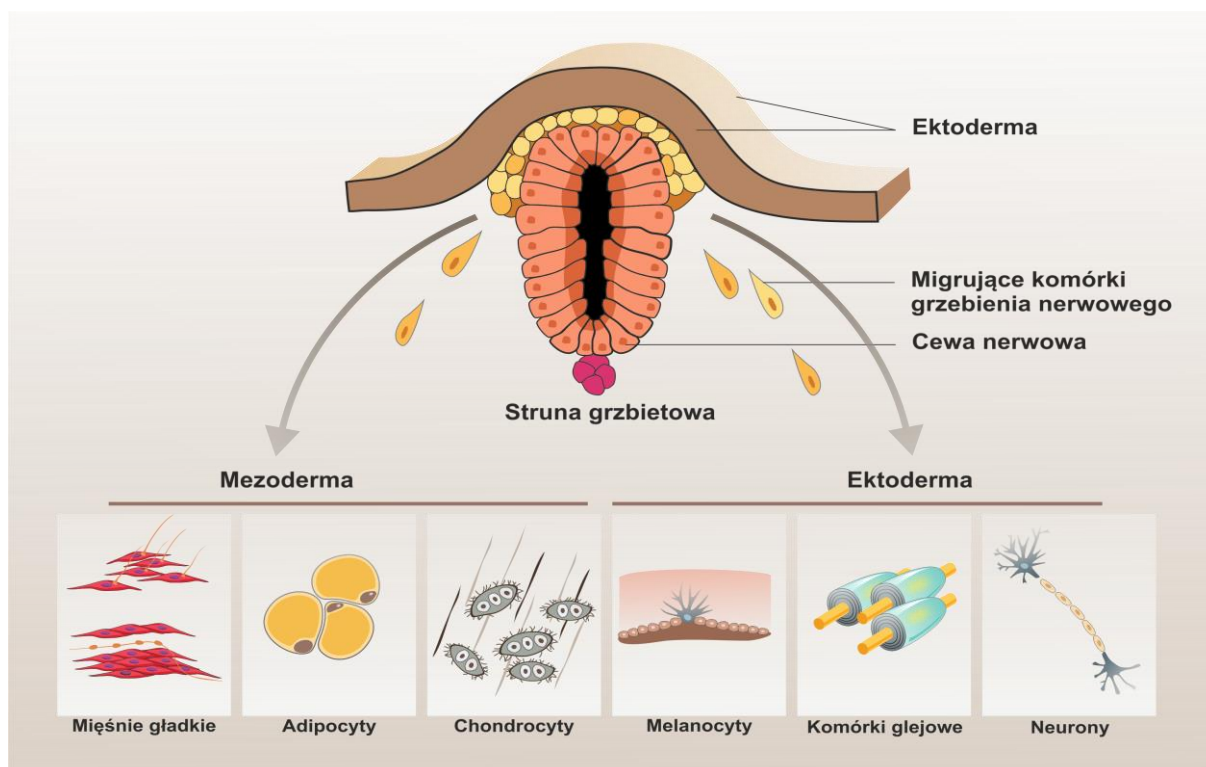
Typ komórek	Pasaż	Aktywowane Ścieżki	Zastosowane czynniki	Czas indukcji	Fenotyp	Ref.
MSC	P3-P4	cAMP, RA	1) RA 2) Forskolina	24 godz.	Nestyna, NSE, MAP2	Bi i wsp., 2010
UCB-MSC	n.s	NT-Raf1- MAPK/ERK,RA	bFGF, RA, BDNF	7 dni	β -tubulina III, NeuN, GFAP,MBP	Lim i wsp., 2008
UCB-MSC	n.s	NT	Transfekcja BDNF		β -tubulin III, NeuN,GFAP	Lim i wsp., 2011
WJ-MSC	P3	NT	BDNF	14 dni	MAP2, AChT	Zhang i wsp., 2012
AT-MSC	n.s	cAMP-NT	bFGF, EGF, BDNF, IBMX	3 dni 24 godz.	β -tubulina III, GFAP	Ying i wsp., 2012
BM-MSC	P3-P4	cAMP-MAPK- MEK-ERK-raf	Forskolina	48 godz.	B-tubulina III, NF200, NSE	Kim i wsp., 2005

n.s. – niespecyficzne, EGF (ang. *Epidermal Growth Factor*), bFGF (ang. *Basic Fibroblast Growth Factor*)

1.4. Koncepcja neuroektodermalnego pochodzenia subpopulacji komórek MSC

Jedną z hipotez, w pewnym stopniu wyjaśniającą sprzeczne doniesienia o neuralnym charakterze różnicowania niektórych populacji MSC, może być pogląd na temat ich pochodzenia rozwojowego. Zakłada on, że wczesna pula komórek MSC podczas rozwoju zarodkowego pochodzi nie z mezodermy ale z komórek neuroepitelium grzebienia nerwowego NCSC (ang. *Neural Crest-derived Stem Cells*) (Takashima i wsp., 2007, Ishii i wsp., 2012). Jednak ze względu na brak możliwości dokładnych badań *in vivo* nasza wiedza na temat pochodzenia ludzkich komórek MSC pozostaje nadal dość ograniczona. Uważa się, że tzw. „klasyczne”, MSC w trakcie rozwoju zarodkowego pochodzą z mezodermy, jednak ostatnie badania wykazały, że najwcześniejsza pula komórek MSC może być generowana z populacji Sox1 (+) pozytywnych komórek struktury grzebienia nerwowego (Takashima i wsp., 2007). Grzebień nerwowy powstaje w czasie neurulacji. Z części ektodermy, pod wpływem indukcyjnym mezodermy osiowej, zaczyna się tworzyć płyta nerwowa. Na jej brzegach tworzą się fałdy nerwowe, które podnosząc się łączą dwa brzegi tworząc cewę nerwową. Komórki, które wcześniej tworzyły brzeg płytki nerwowej wchodzi teraz w skład neuroepitelium grzebienia nerwowego. Gdy cewa nerwowa ulega zamknięciu to właśnie komórki grzebienia w wyniku aktywacji tzw. przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT, ang: *Epithelial* -

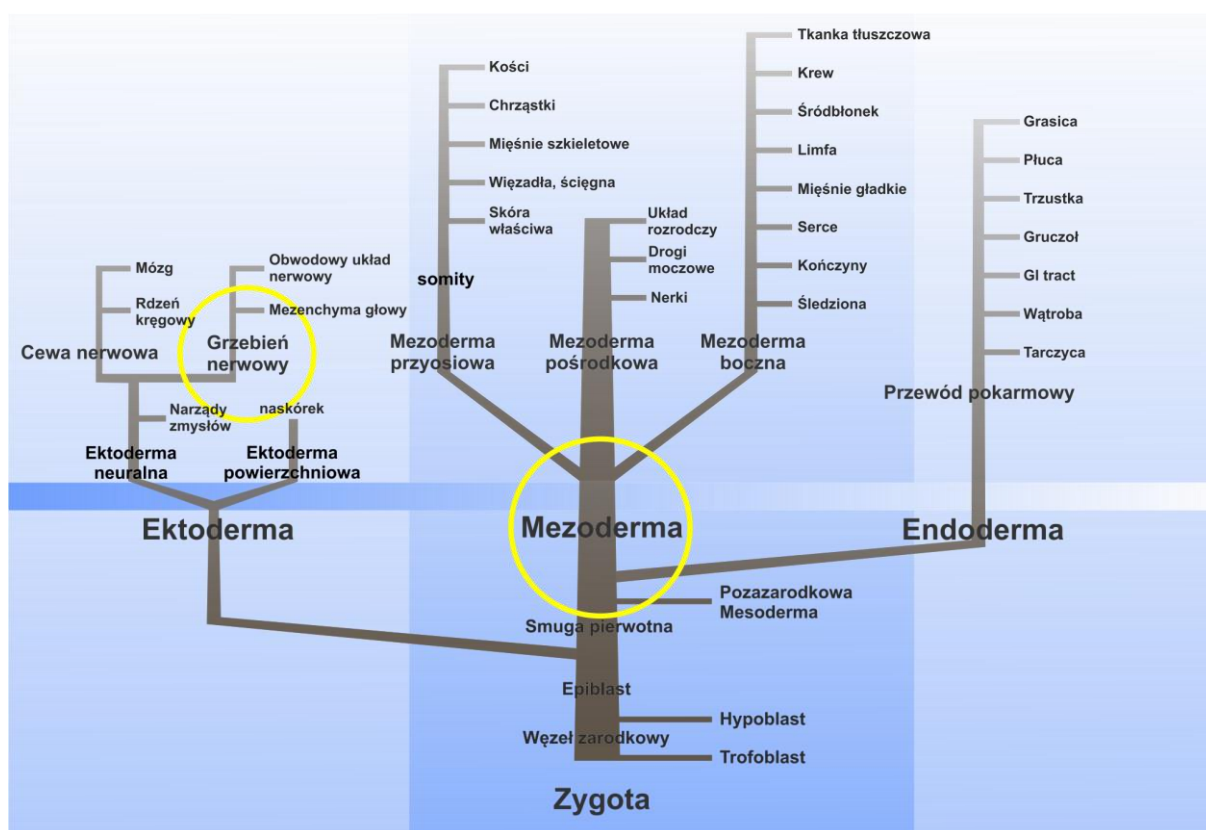
Mesenchymal Transition) rozpoczynają migrację i biorą aktywny udział w zasiedlaniu wielu narządów (Crane i wsp., 2006) (ryc. 3).



Ryc. 3. Schemat aktywacji przejścia epitelialno-mezenchymalnego (EMT). Migrujące komórki ektodermalne z grzebienia nerwowego zasiedlają przejściowo lub trwale nisze macierzyste niektórych narządów.

Pierwsze przesłanki istnienia w dorosłym organizmie komórek macierzystych o łącznym potencjale mezenchymalnym oraz neuralnym wyłoniły się z badań przeprowadzonych na ludzkiej krwi pępowinowej przez zespoły badaczy z naszego Instytutu (Bużańska i wsp., 2002, Habich i wsp., 2006) oraz Storcha (2002) i McGuckina (2004). W kolejnych badaniach w celu precyzyjnego określenia pochodzenia rozwojowego tych komórek zespół innych autorów wykorzystał myszy transgeniczne (*Wnt1-Cre/FloxedEGFP*) z transgenem pod promotorem charakterystycznym dla komórek neuroepitelialnych oraz określonych listków zarodkowych (Takashima i wsp., 2007; Nagoshi i wsp., 2008). Wyniki badań potwierdziły obecność w szpiku kostnym myszy nielicznej populacji komórek pochodzących z grzebienia nerwowego. Komórki te pierwotnie wykazywały zdolności do migracji i zasiedlania różnych narządów oraz w warunkach hodowli *in vitro* do różnicowania się w kierunku neuronów, komórek glejowych oraz mięśni gładkich. Wykazano, że ta wczesna populacja komórek MSC w późniejszym rozwoju zarodkowym zostaje zastąpiona przez komórki mezenchymalne pochodzące z mezodermy (Takashima i wsp., 2007; Foster i wsp., 2008). Uważa się, że komórki z grzebienia nerwowego obecne są nadal w szpiku kostnym dorosłych organizmów,

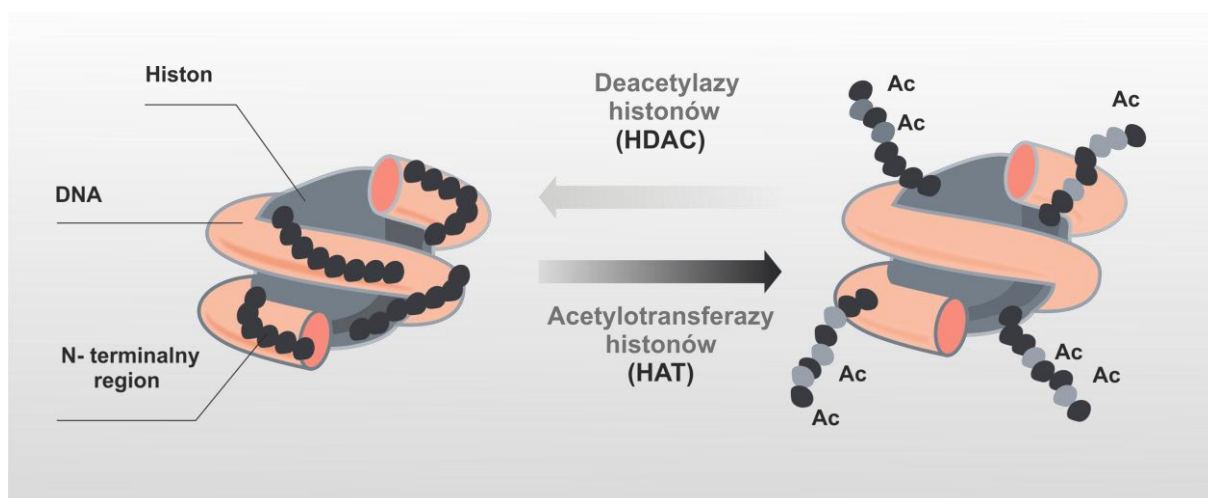
jednak częstotliwość ich występowania drastycznie zmniejsza się wraz z wiekiem (Hermann i wsp., 2010). Kilka lat później związek pomiędzy komórkami NCSC a populacją komórek MSC wykazały również badania zespołu Morikawa (Morikawa i wsp., 2009). Wyodrębnili oni populację komórek MSC o potencjalnych zdolnościach do różnicowania neuralnego, następnie na myszach transgenicznych potwierdzili ich neuroektodermalny charakter. Otrzymane komórki w warunkach hodowli *in vitro* wykazywały zdolność do tworzenia neurosfer oraz ekspresję markerów neuroektodermalnych: Nestyny, Sox10 oraz Pax3. Na podstawie prezentowanych wyników badań wydaje się, że w szczególności tkanki pochodzenia płodowego, ale również i w pełni dojrzałe tkanki, mogą zawierać w zmiennych proporcjach odrębne populacje „dojrzałych” i „niedojrzałych” komórek macierzystych o różnym pochodzeniu rozwojowym. Multipotentne NCSC/ MSC obecne w różnych tkankach dorosłych organizmów mogą stanowić atrakcyjne źródło komórek dla przyszłych terapii zastępowania zniszczonych lub uszkodzonych komórek układu nerwowego.



Ryc. 4. Schemat pochodzenia komórek mezenchymalnych w rozwoju zarodkowym. Klasyczne MSC pochodzą z mezodermy i dają początek m.in. tkance tłuszczowej, chrzęstnej oraz kostnej. Inna populacja komórek preMSC pochodzi z komórek neuroepitelium grzebienia nerwowego i powstaje w wyniku rozwojowego EMT (Obrazek pobrany ze strony <http://www.LifeMap Sciences 2012> - zmodyfikowany).

1.5. Epigenetyczna kontrola różnicowania MSC

Ośrodkowy układ nerwowy ssaków składa się z różnych typów komórek: astrocytów, komórek glejowych oraz oligodendrocytów, które wraz z neuronami są niezbędne do funkcjonowania tej tkanki. Uważa się, że w trakcie rozwoju układu nerwowego cała sieć neuronów powstaje z jednej wspólnej linii neuralnych komórek macierzystych (NSC, ang. *Neural Stem Cell*). Wyjaśnienie mechanizmów, dzięki którym neuralne komórki macierzyste wytwarzają różne rodzaje dojrzałych komórek, pozostaje jednym z głównych wyzwań dla poznania biologii ośrodkowego układu nerwowego. Ostatnie badania wykazały, że epigenetyczne mechanizmy kontroli genów odgrywają tutaj kluczową rolę, regulują wzrost, samoodnawianie oraz przede wszystkim kierunkowe różnicowanie tych komórek. Modyfikacje epigenetyczne obejmują szerokie spektrum, w tym oddziaływania enzymów przebudowy chromatyny, modyfikacje histonów, zaangażowanie niekodującego RNA, które łącznie pośredniczą w specyfikacji neuronalnej oraz utrzymaniu stabilności genomu komórek nerwowych. Uważa się, że komórkowe systemy sygnalizacyjne, kontrolujące wzrost i różnicowanie neuralnych komórek macierzystych działają, przynajmniej częściowo, przez połączenie różnorodnych szlaków sygnałowych i mechanizmów epigenetycznych (Burney i wsp., 2013). Regulacja ekspresji genów na poziomie transkrypcji odbywa się za pomocą zmian epigenetycznych modyfikujących strukturę chromatyny, umożliwiając dostęp dla czynników transkrypcyjnych i innych modulatorów. Do głównych mechanizmów regulacji ekspresji genów zalicza się zmiany opierające się na modyfikacjach histonów oraz metylacjach DNA, w szczególności zmiany umożliwiające transkrypcję przez tworzenie bardziej otwartej konformacji chromatyny (euchromatyna) lub przez jej kondensację (heterochromatyna), co decyduje o dostępności transkrypcyjnej. W epigenetycznej regulacji ekspresji genów komórek NSC kluczową rolę odgrywają reakcje acetylacji i deacetylacji histonów katalizowane przez swoiste enzymy: acetylotransferazy (HAT, ang; histone acetyltransferase) oraz deacetylazy histonów (HDAC, ang: *Histone Deacetyltransferase*) (ryc. 5) (Foti i wsp., 2013). Uważa się, że HAT pełni funkcję koaktywatora transkrypcji określonych genów, zwiększając acetylację chromatyny w odpowiedniej okolicy regulatorowej genu, podczas gdy deacetylacja w tej okolicy jest czynnikiem korepresyjnym.



Ryc. 5. Schemat modyfikacji epigenetycznych histonów: działanie acetylotransferaz - (HAT) i deacetylaz - (HDAC). Zastosowane skróty: Ac (reakcja acetylacji), DNA (kwas dezoksyrybonukleinowy).

Wpływ metylacji na kontrolowanie transkrypcji genu jest natomiast zależny od pozycji reszt lizynowych w strukturze histonów wchodzących w interakcje z genami podlegającymi regulacji. Przyjmuje się, że zwiększenie metylacji lizyny w pozycji 4 histonu H3 (H3K4met) jest uznanym markerem transkrypcyjnie aktywnej chromatyny, natomiast ten sam histon po metylacji w pozycji K9 (H3K9) oraz K27 (H3K27) jest wykładnikiem nieaktywnej transkrypcyjnie chromatyny (Barski i wsp., 2007, <http://epigenie.com/>).

Na podstawie różnic występowania poszczególnych domen, HDAC u ssaków dzieli się na 4 odrębne klasy (Tabela 2) o częściowo specyficznych funkcjach (I, IIa, IIb, III, IV) (Gray i wsp., 2001).

Tabela 2. Klasyfikacja deacetylaz histonów

KLASA	ENZYM
I	HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8
IIa	HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9
IIb	HDAC6, HDAC10
III	SIRT1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
IV	HDAC11

Zastosowane skróty: HDAC (deacetylazy histonów), SIRT (sirtuina)

Badania ostatnich lat wykazały bezpośredni związek pomiędzy posttranslacyjnymi modyfikacjami zarówno DNA (metylacja) jak i histonów (acetylacja i metylacja) w miejscach regulatorowych poszczególnych genów a ich transkrypcją w przebiegu procesu różnicowania neuralnego komórek macierzystych/progenitorowych (Habich i wsp., 2013). Potwierdzono udział deacetylaz HDAC1 i HDAC2 jako kluczowych regulatorów w specyfikacji neuronalnej w czasie rozwoju zarodkowego (Juliandi i wsp., 2010). Udowodniono, że całkowite wyciszenie obydwu tych genów (Montgomery i wsp., 2009) znacznie zaburzało prawidłowy rozwój OUN. Natomiast całkowity brak ekspresji enzymów modyfikujących acetylację/deacetylację chromatyny w trakcie rozwoju i różnicowania okazał się cechą letalną (MacDonald i wsp., 2008).

Inhibitory naturalne lub syntetyczne deacetylaz histonów HDACi (ang. *Histone deacetylase inhibitors*) są uznanymi modyfikatorami epigenetycznymi, które hamując aktywność procesu deacetylacji, mogą kontrolować ekspresję niektórych genów. Inhibitory deacetylaz oddziałując z domeną katalityczną HDAC i w konsekwencji zwiększając poziom acetylacji histonów, prowadzą do utworzenia chromatyny o bardziej otwartej konfiguracji z przywróceniem ekspresji wyciszonych genów. Najczęściej stosowane, również klinicznie, inhibitory HDAC to trichostatyna A (TSA) i kwas walproinowy (VPA). Kwas walproinowy, jest lekiem przeciwpadaczkowym, stosowanym od dziesięcioleci w leczeniu epilepsji, a także w schizofrenii, natomiast TSA jest stosowanym lekiem przeciwnowotworowym. (Stephen i wsp., 2003). Niedawno inhibitory HDAC w tym kwas walproinowy oraz TSA uznano jako substancje zwiększające wydajność reprogramowania zróżnicowanych komórek w kierunku iPS (Gaspar-Maia i wsp., 2011; Hubbard i wsp., 2014; Han i wsp., 2013). Ponadto udowodniono również, że hamowanie aktywności HDAC przez zastosowanie inhibitorów umożliwia acetylację niektórych czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych za zwiększoną ekspresję genów odgrywających kluczową rolę w procesie różnicowania. Badania ostatnich lat wykazały, że zastosowanie określonych inhibitorów HDAC może indukować różnicowanie komórek komórek macierzystych oraz nowotworowych (Svechnikova i wsp., 2008; Koutsounas i wsp., 2013). Wykazano, że hamowanie aktywności HDAC z zastosowaniem kwasu walproinowego (VPA) powodowało w komórkach NSC różnicowanie neuronalne (Hsieh i wsp., 2004; Balasubramanian i wsp., 2006; Yang i wsp., 2014). W doświadczeniach z użyciem VPA obserwowano wzrost różnicowania neuronalnego z równoczesnym zahamowaniem różnicowania w kierunku komórek glejowych. Obserwację potwierdzało zwiększenie ekspresji określonych genów neuronalnych, takich jak czynniki NeuroD, Neurogeniny-1 oraz Mash-1 (ang. Mammalian ac-sc homolog 1) (Hao i wsp., 2004). Zaobserwowano również wpływ TSA na różnicowanie pro-neuronalne w komórkach NSC, łącznie ze spadkiem różnicowania w kierunku astrocytarnym, co może zatem stanowić pomocne narzędzie w opracowaniu

procedury otrzymywania określonej populacji komórek neuronalnych z NSC (Liu i wsp., 2012; Balasubramaniyan i wsp., 2006).

1.6. Wpływ stężenia tlenu na hodowlę komórek MSC

Ważnym parametrem w hodowli komórek zwierzęcych jest tlen, który jest czynnikiem niezbędnym do utrzymania ich prawidłowego metabolizmu, warunkującym wzrost i przeżycie komórek. Uważa się, że zapotrzebowanie na tlen zależy od rodzaju komórek i tempa ich wzrostu (Jorjani i wsp., 1999). Tradycyjną metodą hodowli komórkowych w warunkach *in vitro* stosowaną w większości laboratoriów jest atmosferyczna zawartość tlenu (21%) (150 mm Hg) i dwutlenku węgla (5%). Warunki te są zwykle określane w publikacjach, nieprawidłowym w przypadku hodowli komórkowych *in vitro*, terminem „normoksji”. Zawartość tlenu w tkankach, a szczególnie w niszach komórek macierzystych *in vivo*, jest znacznie niższa niż w warunkach atmosfery ziemskiej i waha się od 2% do 7% (Tabela 3). Również w rozwijającym się zarodku stężenie tlenu utrzymuje się na bardzo niskim poziomie, wynosząc w stadium blastocysty 1%-2% (Gassmann i wsp., 1996, Harvey i wsp., 2004). Ponadto ostatnio wykazano, że warunki niskiego (fizjologicznego) stężenia tlenu w niszy pluripotencjalnych komórek macierzystych oraz w nowotworowych komórkach macierzystych (CSC, ang. *Cancer stem cells*) są konieczne dla utrzymania ich macierzystości (Gordan i wsp., 2007; Szablowska-Gadomska i wsp., 2011). Uważa się, również (w oparciu o własne badania Drela i wsp., 2014), że hipoksja jest istotnym parametrem w niszach tkankowych komórek somatycznych. Nie tylko ze względu na zwolniony metabolizm samej komórki macierzystej i jej zabezpieczenie antyoksydacyjne, ale również pomaga w utrzymaniu, podobnie jak w przypadku ESC czy indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPS ang. *induced Pluripotent Stem Cells*), właściwości odróżnionych komórek o cechach pluripotencjalnych (ang, ESC- like) (dos Santos i wsp., 2010; Basciano i wsp., 2011).

Tabela 3. Stężenie tlenu w różnych tkankach i narządach (Haque i wsp., 2013).

Rodzaj tkanki/narządu	Stężenie tlenu	Źródło literatury
Płuca	4%-14%	Ivanovic i wsp., 2009
Układ krążenia	4%-14%	
Wątroba	4%-14%	Ivanovic i wsp., 2009
Nerki	4%-14%	Ivanovic i wsp., 2009
Serce	4%-14%	
Mózg	0,5%-8%	Panchision i wsp., 2009; Hemphill i wsp., 2005; Erecińska i wsp., 2001; Sharp i wsp., 2004
Oko	1%-5%	Yu i wsp., 2005
Szpik kostny	1%-6%	Chow i wsp., 2001; Eliasson i wsp., 2010
Tkanka tłuszczowa	2%-8%	Pasarica i wsp., 2009

Niektóre dane literaturowe wskazują, że w hodowlach komórek macierzystych prowadzonych w warunkach *in vitro* w niższych stężeniach tlenu (<5% O₂) liczba podwojeń populacji była znacznie wyższa a potencjał do różnicowania i samoodnowy utrzymywał się przez dłuższy czas (Basciano i wsp., 2011; Estrada i wsp., 2012). W przypadku komórek MSC, obniżenie stężenia tlenu wykazuje zarówno korzystne jak i negatywne skutki. Dane z jednej strony przytaczają korzyści płynące z zastosowania obniżonego stężenia tlenu w warunkach hodowli *in vitro*, uważając te warunki za dostosowane fizjologicznie i odzwierciedlające naturalne środowisko niszy (Estrada i wsp., 2012). Z drugiej jednak strony istnieją doniesienia sugerujące, że warunki obniżonego poziomu tlenu mogą prowadzić do zwiększonego ryzyka akumulowania zmian genetycznych, wpływających na niestabilność genomu komórek MSC. W tym przypadku duże znaczenie miało zastosowane stężenie tlenu oraz czas ekspozycji jak również niektóre parametry hodowli, takie jak zastosowane pożywki oraz stężenie surowicy (Potier i wsp., 2007). Ponadto obserwowano również w warunkach obniżonego stężenia tlenu zatrzymanie cyklu podziałowego wraz z możliwością kierunkowego różnicowania komórek MSC (Potier i wsp., 2007b, Holzwarth i wsp., 2010).

Główną rolę w reakcji komórek MSC na niedotlenienie odgrywają czynniki indukowane hipoksją - HIFs (ang. *Hypoxia Inducible Factors*) (Wang i Semenza 1993). Białka HIF są heterodimerycznymi czynnikami transkrypcyjnymi, zawierającymi domeny bHLH (ang. *basic helix-loop-helix*) oraz PAS (ang. *Per-AHR-ARNT-Sim*). W skład HIF wchodzi jedna z trzech podjednostek alfa zależnych od tlenu: HIF-1 α , 2 α , 3 α oraz HIF- β - jednostka podlegająca

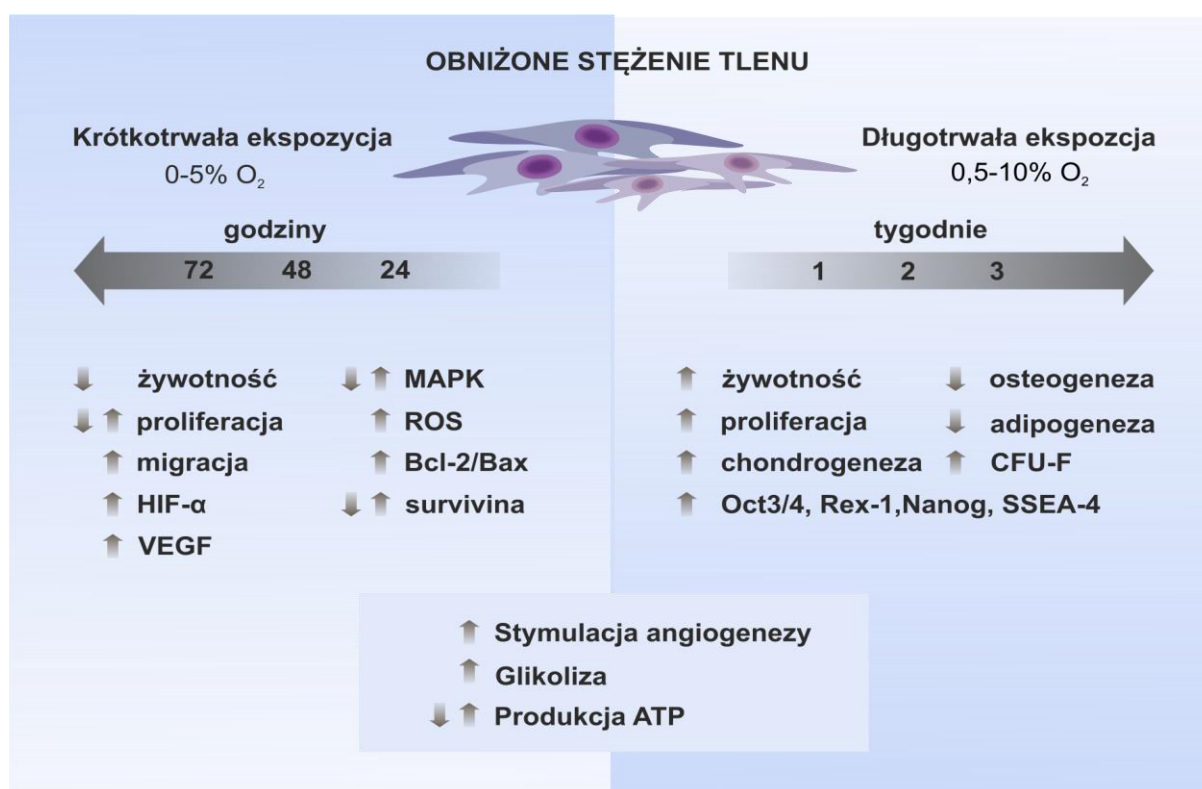
konstytutywnej transkrypcji (Semenza 2003; Zagórska i Dulak 2004). Spośród wymienionych, najlepiej poznana jest podjednostka HIF-1 α , której aktywna forma w warunkach hipoksji stymuluje ekspresję prawie 200 genów (Semenza 2004; Pogodina i wsp., 2014; Park i wsp., 2013). Uważa się, że ekspresja pozostałych HIF może być tkankowo specyficzna, np. ekspresja HIF-2 α jest charakterystyczna przede wszystkim dla hepatocytów, komórek glejowych oraz komórek śródbłona, jak również dla MSC, natomiast dokładna funkcja i rola HIF-3 α nie jest w pełni poznana (Drela i wsp., 2014; Guarnerio i wsp., 2014).

W warunkach dostatecznej ilości tlenu stosunkowo niska ekspresja podjednostki alfa HIF jest kontrolowana przez tlenowo zależne hydroksylazy: prolinową PHD (ang. *Prolyl Hydroxylase Domain*) i asparaginową FIH (ang. *Factor Inhibiting HIF*), których aktywność jest hamowana przez hipoksję. W warunkach normoksyjnych HIF α łączy się z białkiem VHL, które jest częścią kompleksu E3 ligazy ubikwitynowej. Ubikwitynowane HIF α szybko jest rozkładane w proteasomach. W warunkach niskiej dostępności tlenu, hydroksylacja jest zahamowana, co powoduje stabilizację podjednostki HIF α i jej akumulację w jądrze, gdzie tworzy kompleks z podjednostką beta HIF. Powstały kompleks aktywuje ekspresję genów, przyłączając się do odcinków zawierających specyficzną sekwencję HRE (ang. *Hypoxia Response Element* 5'-TACGTG-3' (A/(G)CGTG). Sekwencje te są zlokalizowane w obszarze promotorów lub wzmacniaczy (enhancerów) genów regulujących odpowiedź hipoksyjną. Szlaki sygnałowe aktywowane hipoksją wydają się być wspólne dla szlaków regulujących niektóre cechy „macierzystości” mezenchymalnych komórek macierzystych (Park i wsp., 2013). Według danych literaturowych indukcja HIF-1 w odpowiedzi na niedotlenienie następuje prawie natychmiastowo (Pogodina i wsp., 2014). Eksperymenty na linii komórkowej HeLa S3 wykazały, że pod wpływem obniżonych warunków tlenowych w zakresie 0,02-5% O₂ lub warunków beztlenowych (~ 0% O₂) już po 2 minutach można było wykryć obecność HIF-1 α w jądrze komórkowym. Zawartość HIF w jądrze komórkowym zwiększa się szybko w ciągu 30 minut, po czym następuje spadek szybkości akumulacji, a maksymalny poziom HIF zaobserwowano po 60 minutowej ekspozycji na niedotlenienie (Jewell i wsp., 2001).

Od wielu lat podejmowane są próby oceny wpływu obniżonego stężenia tlenu na komórki MSC w warunkach hodowli *in vitro*. Jednoznaczna analiza odpowiedzi MSC na hipoksję jest dość trudna przede wszystkim ze względu na stosunkowo duży zakres używanych stężeń tlenu oraz różnych czasów ekspozycji, mieszczących się w przedziale od kilku godzin do kilku tygodni.

Podsumowując wyniki doświadczeń z zastosowaniem obniżonych stężeń tlenu można podzielić je na dwa rodzaje: odpowiedź komórek MSC na intensywną, krótkotrwałą hipoksję, oraz odpowiedź komórek MSC pod wpływem długotrwałej hodowli w stosunkowo niższych stężeniach tlenu w przedziale od 0,5-10% (ryc. 6). W tym miejscu należy zaznaczyć, że większość badań opisujących niekorzystny wpływ niedotlenienia na komórki MSC

przeprowadzona była jednocześnie ze znacznie niższymi stężeniami surowicy (Potier i wsp., 2007; Zhang i wsp., 2009), co nie daje jednoznacznych wniosków na temat samych zastosowanych warunków tlenowych. W wielu pracach wykazano, że intensywna hipoksja w połączeniu z obniżeniem stężenia surowicy jest niekorzystna dla komórek MSC. Zastosowane parametry hodowli *in vitro* wywierały efekt proapoptotyczny, zwiększając śmiertelność komórek MSC nawet o 50% (Nie i wsp., 2011; Zhang i wsp., 2009). Pojawiły się również doniesienia sugerujące korzyści z zastosowania w hodowli krótkotrwałego obniżenia stężenia tlenu. Zespół Lavrentieva wykazał zwiększenie zdolności proliferacyjnych komórek MSC, pochodzących ze sznura pępowinowego umieszczonych w atmosferze 1,5% O₂ przez 72 godziny (Lavrentieva i wsp., 2010). Niektórzy autorzy obserwowali wpływ zastosowania krótkotrwałego (6-20 godz.) obniżenia stężenia tlenu na poprawę zdolności migracyjnych komórek MSC (Busletta i wsp., 2011; Hung i wsp., 2007; Lee i wsp., 2010).



Ryc. 6. Schemat przedstawiający wpływ warunków obniżonego stężenia tlenu na komórki MSC. Krótkoterminowa i długoterminowa ekspozycja na warunki niedotlenienia pobudzają odmienne mechanizmy adaptacyjne. Zastosowane skróty: CFU (ośrodki tworzące kolonie), ROS (reaktywne formy tlenu), MAPK (kinazy aktywowane mitogenami), HIF- α (czynniki indukowane hipoksją podjednostka α), VEGF (ang. Vascular Endothelial Growth Factor - czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego).

Interpretacja doniesień na temat długotrwałej hipoksji w hodowlach komórek MSC tzn. prowadzonych przez kilka pasaży również nie prowadzi do jednoznacznych wniosków. Jednak liczne badania wykazały, że MSC, które przez dłuższy czas są hodowane w niskim stężeniu tlenu w (1-5%), wykazują większy potencjał proliferacyjny (Basciano i wsp., 2011; D'Ippolito i wsp., 2006; Dos Santos i wsp., 2010, Fehrer i wsp., 2007). Mechanizmy adaptacji komórek MSC oraz prawidłowa ocena skutków zastosowania obniżenia stężenia tlenu w środowisku hodowli *in vitro* nie są w pełni wyjaśnione.

Uważa się, że stabilizacja czynników HIF- α , odgrywa ważną rolę w fizjologii komórek MSC i jest bezpośrednio związana z odpowiedzią adaptacyjną na warunki obniżenia stężenia tlenu. Wydaje się, że czynniki HIF- α są głównym regulatorem kontroli metabolizmu i zdolności multipotencjalnych komórek MSC (Mohyeldin i wsp., 2010; Palomaki i wsp., 2013). Stabilizacja czynnika HIF-1 α wywiera selektywny wpływ na tworzące się kolonie prekursorów mezenchymalnych promując ich samoodnawianie. Równolegle z naszymi badaniami (Drela i wsp., 2014) wykazano, że stabilizacja HIF-1 α może prowadzić do indukcji genów pluripotencjalnych (Oct-3/4) w komórkach MSC oraz zahamowania różnicowania w kierunku adipocytów i komórek tkanki kostnej (Park i wsp., 2013). W innych badaniach autorzy postulowali również w utrzymaniu nieodróżnicowanego stanu komórek MSC kluczowy udział czynnika HIF-2 α (Covello i wsp., 2006; Patel i wsp. 2008). Ostatnie badania wykazały, że komórki MSC hodowane w warunkach obniżonego do 5% stężenia tlenu dłużej pozostają w stanie nieodróżnicowanym, który jest związany z ekspresją czynników transkrypcyjnych m.in. Oct3/4 i Nanog (Basciano i wsp., 2011) co również zostało potwierdzone w naszych badaniach (Drela i wsp., 2014). Informacje na temat wpływu obniżonego stężenia tlenu na ekspresję markerów pluripotencji nie są jednoznaczne a szczegółowy mechanizm tego działania w dalszym ciągu nie został do końca wyjaśniony

Produkty genów Oct3/4 i Nanog określa się jako markery pluripotencjalnych komórek macierzystych i uważa się je za niezbędne do utrzymania tego stanu (Greco i wsp., 2007). Ulegają one ekspresji na wczesnych etapach rozwoju zarodkowego, w dojrzałym organizmie ich ekspresja zanika. Dawniej uważano, że w dorosłym organizmie nie ma komórek wykazujących ekspresję Oct-4. Jednak w ostatnich latach udało się wykryć Oct-4 pozytywne populacje komórkowe np. w tkankach płodu i innych komórkach macierzystych /progenitorowych (Habich i wsp., 2006, 2011). Wątpliwości na temat ekspresji Oct3/4 po części zostały zweryfikowane w 2008 roku, kiedy zidentyfikowano różne warianty transkrypcyjne tego genu. Według najnowszych danych literaturowych Oct3/4 (zwany również POU5F1, OCT3, OCT3/4, OTF3, OTF4) może dawać trzy transkrypty: OCT4A, OCT4B, OCT4B1 oraz aż cztery izoformy białka: OCT4A, OCT4B-190, OCT4B-265 i OCT4B-164, spośród których tylko OCT3/4A jest odpowiedzialny za pluripotencjalne właściwości komórek macierzystych (Masui i wsp., 2007). Fałszywie pozytywne wyniki ekspresji tego genu, uzyskane przez wielu badaczy,

były związane z zastosowaniem nieprawidłowych starterów jak również z obecnością w identyfikowanych próbach tzw. transkryptów pseudogenów i kontaminacji genomowym DNA (Szade i wsp., 2013).

1.7. Zastosowanie mezenchymalnych komórek macierzystych w medycynie

W bardzo szybkim tempie rośnie liczba prób klinicznych z wykorzystaniem komórek MSC w medycynie regeneracyjnej (ClinicalTrials.gov). Dane eksperymentalne i obiecujące wyniki badań przedklinicznych pokazują, że podanie MSC wywiera pozytywny efekt w różnych jednostkach chorobowych. Jednak mimo otrzymania wielu pozytywnych wyników w ciągu ostatniej dekady, duża liczba pytań związanych z biologią komórek MSC pozostaje nadal otwarta. Istnieje szereg niejasności pomiędzy immunofenotypem MSC a pełnioną funkcją, zdolnością przetrwania po przeszczepie, drogą podania, typem przeszczepu (autologicznym lub allogenicznym). Nie wiadomo również czy niektóre właściwości komórek, takie jak np. potencjalna zdolność do transdyferencjacji w warunkach *in vitro*, utrzymują się po przeszczepie. Pojawiło się wiele badań udowadniających, że MSC są zdolne do modulacji funkcji układu odpornościowego, przez co znalazły zastosowanie jako komórki towarzyszące podczas przeszczepów w leczeniu choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD - *Graft versus Host Disease*) (Weng i wsp., 2010; Zhao i wsp., 2015). Obiecujące wyniki badań uzyskano również w leczeniu choroby Leśniowskiego-Crohna (CD, ang. *Crohn Disease*) o podłożu zapalnym, w której dochodzi do powstania przetoki odbytu trudnej w leczeniu operacyjnym, obciążonym dużą liczbą powikłań, w tym ryzyka resekcji jelita. Pomimo znacznego postępu stosowanych technik leczenie pacjentów z CD pozostaje trudnym zadaniem, z wysokim ryzykiem nawrotu choroby. Mezenchymalne komórki macierzyste, dzięki ogromnemu potencjałowi regeneracyjnemu, są obecnie stosowane w leczeniu przetok w chorobie Crohna oraz o innej etiologii. Dane zebrane z analizy różnych przypadków klinicznych pokazują, że całkowite wyleczenie przetoki można osiągnąć po kilku lokalnych podaniach komórek MSC (Rydzewska i wsp., niepublikowane) lub w połączeniu z leczeniem infliksymabem i azatiopryną (Forbes i wsp., 2014).

W dotychczasowych badaniach wykazano korzystny wpływ MSC przede wszystkim w leczeniu układu kostno-stawowego. Obecnie podejmowane są próby badań nad zastosowaniem mezenchymalnych komórek macierzystych we wrodzonej łamliwości kości (OI, ang: *Osteogenesis Imperfecta*), chorobie uwarunkowanej genetycznie związanej z wytwarzaniem nieprawidłowej formy kolagenu typu I (Horwitz i wsp., 2002). Wykazano, że przeszczepianie komórek MSC wpływa korzystnie na złagodzenie uszkodzeń kośćca. W badaniu klinicznym transplantacja prenatalna komórek MSC u 31 tygodniowych płodów z

ultrasonograficznie potwierdzonym rozpoznaniem *Osteogenesis Imperfecta* wykazała znaczną poprawę stanu pacjentów. Transplantacja MSC pacjentom obniżyła częstość występowania u nich złamań i nieprawidłowości w budowie szkieletu (Götherström i wsp., 2014). W celu wzmocnienia efektu terapeutycznego u dwóch pacjentów wykonano przeszczep uzupełniający, w wieku 18 miesięcy po urodzeniu i 8 lat powtórnie przeszczepiono komórki MSC. Efekty przeszczepów prenatalnych w połączeniu z transplantacją po narodzinach dały korzyści kliniczne, jednak do pełnej oceny skuteczności zaproponowanej terapii potrzebne są badania większej grupy pacjentów. Podjęto również liczne próby zastosowania komórek mezenchymalnych w leczeniu i regeneracji uszkodzonych więzadeł i ścięgien (Gulotta i wsp., 2012).

Ostatnio prowadzone są również badania nad możliwością zastosowania mezenchymalnych komórek macierzystych w chorobach serca. Przeprowadzono szereg badań wskazujących na skuteczność zastosowania tych komórek do zmniejszania blizn pozawałowych oraz przywracania prawidłowej funkcji skurczowej w przypadku zawału mięśnia sercowego. Jednak dokładny mechanizm, dzięki któremu MSC przyczyniają się do regeneracji mięśnia sercowego nadal nie jest w pełni poznany (Zhao i wsp., 2012; Lopez i wsp., 2013). Prawdopodobnie może być to efekt wieloczynnikowy składający się z bezpośredniej zdolności komórek mezenchymalnych do różnicowania w kierunku kardiomiocytów, komórek mięśni gładkich, komórek śródbłonna naczyń oraz zdolności MSC do wydzielania szeregu cytokin oraz czynników o właściwościach troficznymi. Dzięki właściwościom immunosupresyjnym MSC mogą przyczyniać się również do łagodzenia stanu zapalnego oraz stymulacji endogennych mechanizmów naprawy.

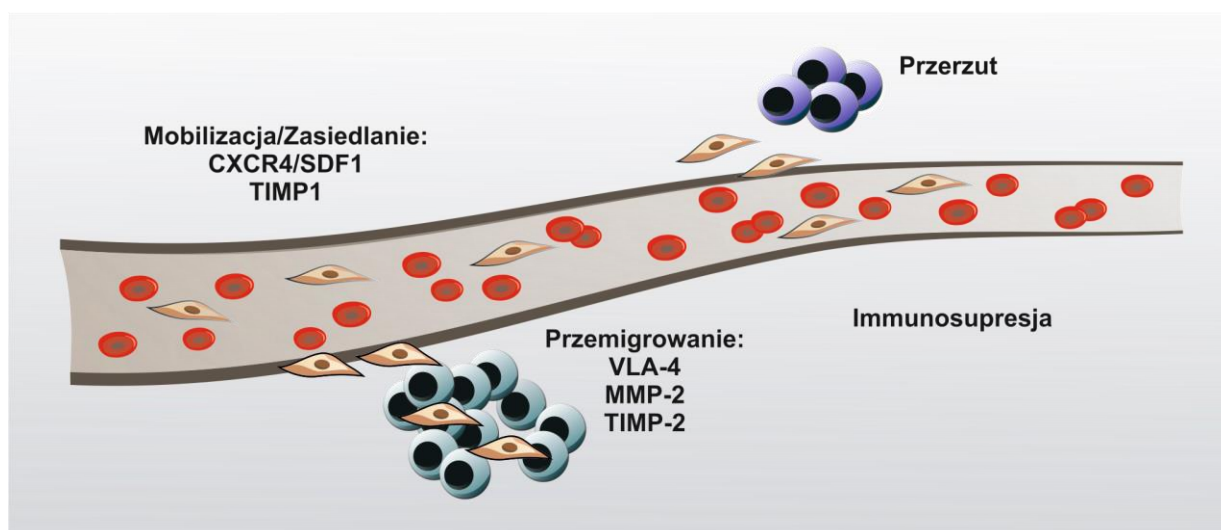
Koncepcja klinicznego zastosowania MSC wydaje się być wielką nadzieją w leczeniu chorób neurologicznych zarówno tych o charakterze neurodegeneracyjnym jak i w uszkodzeniach ośrodkowego układu nerwowego powstałych w wyniku udaru czy urazu. Wydaje się, że mezenchymalne komórki macierzyste mogą mieć zastosowanie w bezpośredniej regeneracji struktury komórkowej układu nerwowego nie tylko ze względu na swoje funkcje immunomodulacyjne i neurotroficzne, lecz też ze względu na swoje potencjalne zdolności do różnicowania. Właściwości neuroprotektoryjne i neuroregeneracyjne przeszczepu komórek MSC, można łączyć z produkcją przez nie licznych, ważnych dla neuronów czynników wzrostowych, przeciwzapalnych i antyapoptotycznych. Obserwacje niektórych badaczy dowodzą, że MSC ze względu na swoje w/w funkcje mogą być odpowiedzialne za ochronę nowopowstałych neuronów, ich proliferację i dojrzewanie. Stwierdzono, że przeszczepione ludzkie MSC w modelu udaru lub urazu u zwierząt mogą sprzyjać znacznej poprawie funkcji motorycznych (Sarnowska i wsp., 2013; Gornicka-Pawlak i wsp., 2011). Obserwowany efekt kojarzony był z antyapoptotycznym działaniem i produkcją czynników przez komórki MSC stymulujących przetrwanie neuronów (Anbari i wsp., 2014; Yin i wsp. 2014,

Gu i wsp. 2014). Poznanie fizjologicznej roli neurotrofin w utrzymaniu homeostazy ośrodkowego układu nerwowego oraz regeneracji uszkodzonej tkanki rozbudziło nadzieję na wykorzystanie ich w leczeniu ciężkich schorzeń neurodegeneracyjnych, m.in. stwardnienia zanikowego bocznego (*ALS, Amyotrophic Lateral Sclerosis*) oraz stwardnienia rozsianego (*SM, Sclerosis Multiplex*). Neurotrofiny odgrywają kluczową rolę w procesie różnicowania i przeżycia neuronów w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, a także są związane z plastycznością synaptyczną będącą podstawą uczenia się i pamięci. Głównym źródłem czynników neurotroficznych są komórki nerwowe, ale ostatnio uważa się, że mogą być one produkowane także przez inne komórki, w tym mezenchymalne komórki macierzyste (Paczkowska i wsp., 2013; Sadan i wsp., 2012). Neurotrofiny, w szczególności czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (BDNF), czynnik wzrostu nerwów (NGF), neurotrofina 3 i neurotrofina 4/5, mogą pełnić funkcję neuroprotekcijną w stwardnieniu rozsianym, spowalniając tempo zmian atroficznych oraz mogą wpływać na funkcjonalną sieć połączeń neuronalnych i poprawę funkcji poznawczych u pacjentów. Dowody na potencjał neuroprotekcyny neurotrofin uzyskano dotychczas przede wszystkim w badaniach przeprowadzonych na modelach zwierzęcych (Lykissas i wsp., 2007; Gordon 2009). Coraz więcej doniesień sugeruje, że neurotrofiny wydzielane przez MSC mogą okazać się użyteczne jeszcze w wielu innych chorobach neurodegeneracyjnych: chorobie Parkinsona, chorobie Alzheimera, u chorych po udarach mózgu i urazach rdzenia (Paczkowska i wsp., 2014; Bhanot i wsp. 2011, Drela i wsp, 2013, Machaliński wsp., 2012).

Dość ciekawym pomysłem na zastosowanie komórek MSC w medycynie jest wykorzystanie ich w leczeniu różnych rodzajów nowotworów, jako specjalnie zaprojektowanych nośników dostarczających substancje terapeutyczne o działaniu przeciwnowotworowym (np. genów kodujących antyangiogenne białka lub genów kodujących tzw. geny samobójcze) (Yi i wsp., 2013). Komórki MSC wykazują wysoką chemotaksję do miejsc uszkodzenia, rejonów objętych odczynem zapalnym i niedotlenieniem a właśnie w tego typu rejonach znajdują się komórki nowotworowe. Zmodyfikowane genetycznie MSC mogą pełnić rolę wektorów dostarczających samobójcze geny lub substancje terapeutyczne do stransformowanych komórek guza (Mavroudi i wsp., 2014; Zarogoulidis i wsp., 2013; Kim i wsp., 2014). Są to najczęściej białka indukujące w komórkach nowotworowych apoptozę (Grisendi i wsp., 2010) lub blokujące określone ścieżki związane z produkcją czynników wzrostu, aktywnością enzymów, które biorą udział w powstawaniu, wzroście i proliferacji komórek nowotworowych.

1.8. Potencjalne ryzyko terapii komórkowych

Mezenchymalne komórki macierzyste stanowią nowe obiecujące podejście w leczeniu wielu chorób, jednak mimo pozytywnych wyników wciąż brak jest danych na temat ryzyka i ewentualnych odległych efektów ubocznych ich zastosowania. Brak jest też danych obejmujących analizy długoterminowych badań w kontekście możliwych zagrożeń wynikających w szczególności z możliwości wystąpienia transformacji nowotworowej. Chociaż do tej pory nie ma doniesień na temat powstawania nowotworów u ludzi po przeszczepie komórek MSC, odległe ryzyko w wyniku terapii komórkowej nadal pozostaje. Istnieje natomiast szereg sprzecznych doniesień o spontanicznej transformacji MSC w warunkach hodowli *in vitro*. W zależności od zastosowanego gatunku i źródła pochodzenia MSC oraz stosowanych technik hodowli i czasu ekspansji *in vitro* obserwowano różne efekty (Bernardo i wsp., 2007; Miura i wsp., 2006; Tang i wsp., 2013). Ryzyko spontanicznej transformacji komórek MSC w wyniku przedłużonej hodowli wykazano w pracy opisującej populację komórek ze szpiku i krwi pwpowinowej (Tang i wsp., 2013). Bernardo i współpracownicy udowodnili, że MSC w warunkach hodowli *in vitro* zachowują prawidłowy fenotyp oraz budowę morfologiczną łącznie z zachowaniem prawidłowych funkcji komórek przez dłuższy czas. Podczas 44 tygodniowej hodowli nie zaobserwowano też zmian w karyotypie komórek (Bernardo i wsp., 2007).



Ryc. 7. Schemat interakcji komórek MSC z komórkami guza. Migracja komórek MSC do miejsc uszkodzenia/nowotworu. Właściwości immunomodulacyjne i wydzielane czynniki przez komórki MSC mogą promować przerzutowość guza. Zastosowane skróty: CXCR4 (receptor dla chemokin z rodziny CXC), SDF1 (czynnik pochodzenia stromalnego 1), TIMP1,2 (inhibitory metaloproteinaz) VLA-4 (integryna). Schemat wykonano na podstawie (Yen i wsp., 2008).

Innym problemem wynikającym z transplantacji komórek MSC oprócz bezpośredniej transformacji może być ryzyko związane ze stymulacją już istniejącego rozrostu nowotworowego przez MSC. Dzięki swoim zdolnościom migracyjnym przeszczepione MSC dążą do miejsca rozrostu nowotworowego, stymulują proliferację komórek guza, promują angiogenezę i wspierają przerzut nowotworu (ryc. 7). W tym przypadku konieczna jest wcześniejsza precyzyjna diagnostyka i selekcja pacjentów wskazanych do terapii komórkowej. Otrzymane wyniki wskazują, że immunosupresyjne środowisko utworzone przez komórki MSC promuje również przerzuty guza w mechanizmie tzw. przejścia epitelialno - mezenchymalnego, ułatwiającego migrację komórek (Ljujic i wsp., 2013). W badaniach innych autorów wykazano, że współhodowla komórek nowotworowych z MSC przyspiesza ekspansję guza (Xu i wsp., 2009; Zimmerlin i wsp. 2011). W obliczu wielkiego entuzjazmu terapii komórkami macierzystymi należy zachować ostrożność i uwzględnić wszystkie możliwe, również jej negatywne skutki.

2. CELE PRACY

Wprowadzenie MSC do kliniki wymaga wielu badań przedklinicznych, polegających m.in. na optymalizacji pozyskiwania, warunków hodowli oraz identyfikacji otrzymanych mezenchymalnych komórek macierzystych w badaniach *in vitro*.

Celem pracy była analiza porównawcza oraz wybór optymalnego rodzaju i metody uzyskiwania ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych z łatwo dostępnych źródeł jakimi są szpik kostny oraz tkanki popłodowe tj. galareta Whartona i krew pępowinowa. Dalsze badania prowadzono w celu scharakteryzowania, dostosowania i wzmocnienia tych cech hodowli mezenchymalnych komórek macierzystych, które są istotne w terapii komórkowej chorób układu nerwowego.

I etap projektu był poświęcony: a) opracowaniu wydajnych metod izolacji oraz ustaleniu optymalnych warunków hodowli *in vitro* dla MSC wyizolowanych z wyżej wymienionych źródeł b) charakterystyce otrzymanych subpopulacji komórek poprzez analizę ekspresji typowych markerów dla komórek MSC na poziomie mRNA i białka c) określeniu zdolności MSC do różnicowania w komórki linii mezodermalnej: adipocyty, chondrocyty oraz osteocyty. d) porównaniu tempa proliferacji i indukcji zmian związanych ze starzeniem w badanych populacjach komórek MSC.

II etap to ocena spontanicznego i indukowanego potencjału do różnicowania pro-neuralnego badanych populacji komórek mezenchymalnych poprzez identyfikację ekspresji typowych markerów neuralnych na poziomie mRNA i białka. W celu indukcji różnicowania neuralnego zastosowano wybrane czynniki o charakterze neuro-morfogenów w połączeniu z modyfikacją epigenetyczną poziomu acetylacji histonów przez zastosowanie inhibitora deacetylazy histonów - TSA. Oceniano towarzyszące temu procesowi zmiany fenotypu komórek wraz z analizą profilu ekspresji wybranych genów i białek charakterystycznych dla komórek znajdujących się na różnych poziomach procesu różnicowania.

III etap badań to porównanie potencjału neuroprotekcijnego związanego z działaniem parakrynnym WJ-MSK (ang. *Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells*) i BM-MSK (ang. *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*). Określono aktywność transkrypcyjną wybranych czynników wzrostowych i troficznych w tych komórkach oraz ekspresję ich receptorów włączonych w proces naprawy uszkodzonej tkanki nerwowej.

IV etap projektu dotyczył określenia reakcji MSC na obniżenie do 5% stężenia parcjalnego tlenu w środowisku hodowlanym w celu zwiększenia plastyczności, szybkości proliferacji i żywotności komórek przy zachowaniu stabilności kariotypu.

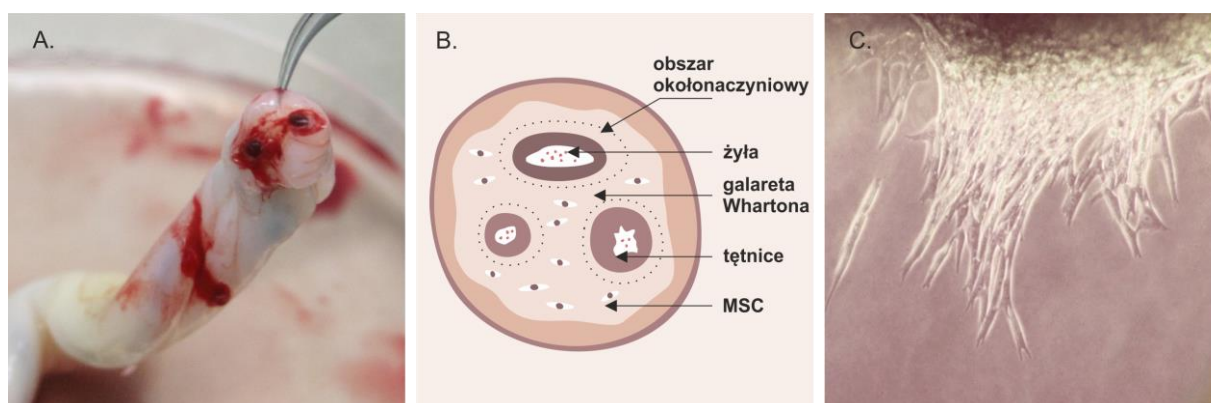
3. MATERIAŁ

3.1. Izolacja ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych z galarety Whartona sznura pępowinowego (WJ-MSC)

Materiał: fragment sznura pępowinowego (15 cm) pobrany bezpośrednio po porodzie uzyskany za zgodą matki i Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (KB 33/2012). Materiał otrzymano z oddziału położniczego Szpitala Klinicznego Dzieciątka Jezus Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego.

Procedura izolacji komórek mezenchymalnych z galarety Whartona sznura pępowinowego (WJ-MSC)

1. Sznur pępowinowy pobierany był do roztworu PBS (ang. *Phosphate buffered saline* - buforowany roztwór soli, Gibco) z dodatkiem antybiotyku AAS (ang. *Antibiotic Antimycotic Solution*, Gibco) o stężeniu 1:100, następnie po wielokrotnym przepłukaniu umieszczony był na szalce Petriego i cięty w poprzek za pomocą skalpela na mniejsze skrawki grubości około 2-3 mm.
2. Z otrzymanych skrawków z obszarów nie zawierających naczyń krwionośnych oraz oddalonych od błony zewnętrznej narzędziem do biopsji (Miltex) wycięte zostały cylindryczne fragmenty galarety Whartona o średnicy 2 mm.



Ryc. 8. Izolacja komórek MSC z galarety Whartona. Fragment sznura pępowinowego umieszczony na szalce Petriego z uwidocznionymi naczyniami krwionośnymi A); Schemat przekroju poprzecznego przez fragment sznura pępowinowego B); migrujące komórki ze skrawka galarety Whartona C).

3. Uzyskane eksplanty galarety Whartona przenoszono do butelek hodowlanych o powierzchni 25 cm² w liczbie 15 skrawków/butelkę uzupełniając do całkowitej objętości 2,5 ml pożywką przeznaczoną do hodowli ludzkich komórek mezenchymalnych (MSCGM Bullet kit, Lonza).
4. Hodowlę pierwotną prowadzono w standardowych warunkach (21% zawartość tlenu, 5% CO₂, o wilgotność 95% i temperatura 37°C) przez 10-14 dni, aż do uzyskania przywierających do podłoża mezenchymalnych komórek macierzystych, zarastających powierzchnię szalek
5. W celu utrzymania stałego poziomu proliferacji komórki pasażowano zmieniając pożywkę co 3-4 dni i przesiewając do nowych butelek hodowlanych po osiągnięciu 80% konfluencji w gęstości 3x10³ komórek/cm². Świeże komórki pobierano do dalszych eksperymentów i procedur lub zamrażano do późniejszych badań.

Pozostałości tkanek po izolacji materiału były utylizowane według programu gospodarowania ludzkimi odpadami medycznymi zatwierdzonego przez Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego PAN.

3.2. Izolacja ludzkich komórek macierzystych z krwi pępowinowej (frakcja komórek jednojądrzastych i mezenchymalnych komórek macierzystych)

Materiał: 80-100 ml krwi pępowinowej pobranej bezpośrednio po porodzie do specjalnych pojemników przeznaczonych do pobierania i przechowywania krwi pępowinowej z płynem konserwującym CPD. Materiał otrzymany za zgodą matki oraz Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (KB 33/2012) pochodził z oddziału położniczego Szpitala Klinicznego Dzieciątka Jezus.

Procedura izolacji komórek mezenchymalnych z krwi pępowinowej (UCB-MSC)

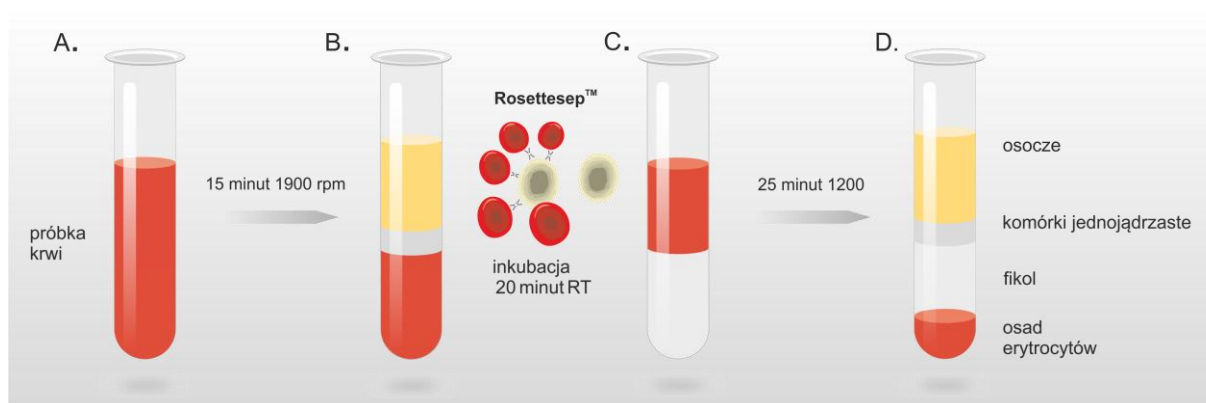
1. Krew pępowinową umieszczano w probówkach typu falcon (50 ml) i wirowano z prędkością 1900 rpm przez 15 minut (ryc. 9, A). Do wszystkich wirowań zastosowano wirówkę Thermo Scientific - Heraeus Megafuge 11, rotor wychylony o promieniu 169 mm.
2. Wirowanie prowadziło do rozdzielenia krwi na 3 frakcje: na samym dole 1) koncentrat erytrocytów 2) biały pierścień tzw. kożuszek leukocytaro-płytkowy oraz 3) osocze (ryc. 9 B)
3. Po wirowaniu strożnie zbierano pipetą biały pierścień komórek jednojądrzastych (MNC, ang. *Mononuclear Cells*) z niewielką ilością erytrocytów.
4. Otrzymaną frakcję inkubowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej z komercyjnym zestawem przeciwciał RosetteSep (50 µl na 1 ml próbki) przeznaczonym do izolacji

mezenchymalnych komórek macierzystych. Zestaw przeciwciał Rosettesep™ został zaprojektowany w celu selekcji negatywnej mezenchymalnych komórek macierzystych. Zawiera on kompleksy tetramerycznych przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom powierzchniowym ludzkich komórek hematopoetycznych (CD3, CD14, CD19, CD38, CD66b) oraz glikoforynie A, występującej na powierzchni erytrocytów (ryc. 9).

5. Otrzymany materiał rozcieńczony buforem CliniMACS (500 ml PBS, 12,5 ml Albumina, 2 ml EDTA 2 mM w proporcji 1:2) ostrożnie nawarstwiano na mieszaninę fikolu (Ficoll-Paque PLUS, GE Healthcare) o gęstości 1.078 g/dm³ w proporcji 1:2 (15 ml fikol/30 próbki) i wirowano przez 25 minut z prędkością 1200 rpm. Po odwirowaniu na gradiencie fikolu w osadzie pozostawały kompleksy przeciwciał połączone z erytrocytami oraz eliminowanymi typami komórek (Ryc. 9 C,D).

7. Po rozdzieleniu zbierano pożądaną frakcję tzw. biały pierścień powstały na granicy faz zawierający komórki jednojądrzaste MNC, które następnie płukano przez wirowanie 10 minut, 1200 rpm w temperaturze pokojowej (Ryc. 9 D)

6. Otrzymany osad komórek zawieszono w buforze CliniMACS, następnie kolejny raz wirowano z zachowaniem tych samych parametrów.



Ryc. 9. Schemat izolacji mezenchymalnych komórek macierzystych z krwi pępowinowej metodą selekcji negatywnej z zastosowaniem zestawu RosetteSep. Pierwsze wirowanie próbki-rozdział faz B). Tetrameryczne kompleksy przeciwciał połączone pomiędzy glikoforyną A na powierzchni erytrocytów a komórką eliminowaną (CD3⁺, CD14⁺, CD19⁺, CD38⁺, CD66b⁺). Rozdział faz po 25 minutowym wirowaniu - frakcja komórek jednojądrzastych zawierająca komórki MSC (D).

7. Końcowy osad komórek zawieszono w 2 ml pożywki do hodowli komórek MSC firmy Lonza i wysiewano do naczyń hodowlanych w gęstości >10⁷ komórek na szalkę o powierzchni 2 cm².

8. Szalki z wysianymi komórkami inkubowano w temperaturze 37°C 21% O₂ przy 95% wilgotności przez 48 godz. do pierwszej wymiany pożywki, pozostawiając jedynie komórki przyklejone. Kolejne zmiany pożywki odbywały się w odstępach 2-3 dniowych. Otrzymane

komórki UBC-MSC pasażowano w momencie osiągnięcia 80% konfluencji oraz prowadzono standardową metodę kontynuacji hodowli.

3.3. Izolacja ludzkich komórek macierzystych ze szpiku kostnego (BM-MSC)

Materiał: 10-20 ml ludzkiego szpiku kostnego pobieranego z jamy szpikowej talerza biodrowego do rozcieńczonego roztworu antykoagulantu (9ml soli fizjologicznej i 1ml 1000 U heparyny). Materiał pochodził z kliniki ortopedycznej ORTOPEDICA i był pobierany za zgodą pacjenta wg. procedury zaakceptowanej przez Komisję Bioetyczną przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Warszawie.

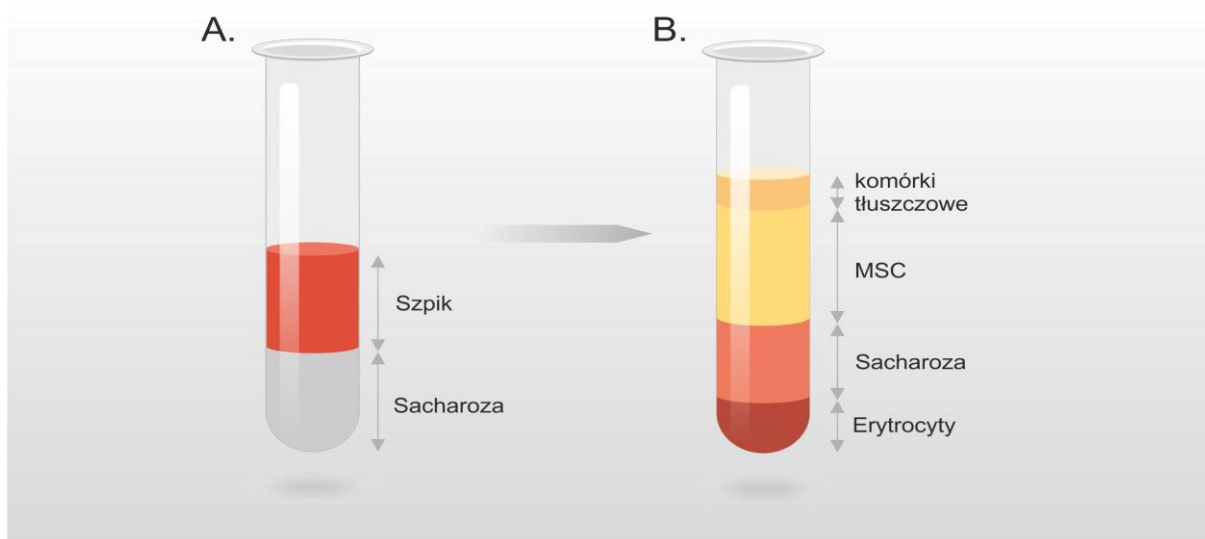
I. Procedura izolacji mezenchymalnych komórek macierzystych ze szpiku (BM-MSC) metodą wirowania na gradiencie ficolu

1. Szpik kostny o objętości 10-20 ml w obecności antykoagulantu, roztworu heparyny (1 ml 1000U) umieszczano w probówkach typu falcon (50 ml) a następnie delikatnie nawarstwiano na mieszaninę fikolu (Ficoll-Paque Plus, Healthcare) o gęstości 1.078 g/dm³ w proporcji 1:2. Po nawarstwieniu, próbki szpiku wirowano przez 20 minut w temperaturze pokojowej z prędkością 1600 rpm.
2. Po uzyskaniu rozdziału faz izolowano pierścień komórek jednojądrzastych. Uzyskane komórki dwukrotnie płukano roztworem buforu PBS z antybiotykiem i wirowano przez 10 min. w temperaturze pokojowej przy szybkości 1400 rpm.
3. Nadsącz usuwano, a pozostały osad komórek jednojądrzastych zawieszano w pożywce hodowlanej do komórek MSC (Lonza) i wysiewano do naczyń hodowlanych w gęstości $>10^7$ komórek na szalkę o powierzchni 2 cm².
4. Szalki z komórkami pochodzenia szpikowego umieszczano w standardowych warunkach hodowli w 37°C oraz 21% stężeniu tlenu. Pierwszej wymiany pożywki dokonywano po 48 godzinach pozostawiając komórki przylegające do podłoża i hodowano je w kolejnych pasażach z wymianą pożywki co 2-3 dni.

Podjęto próby uzyskiwania komórek MSC również innymi metodami opisanymi poniżej, jednak ze względu na wysoką zmienność, mniejszą wydajność i brak powtarzalności nie zostały one wykorzystane w dalszej pracy.

II. Procedura izolacji mezenchymalnych komórek macierzystych ze szpiku (BM-MSC) alternatywną metodą wirowania na gradiencie sacharozy (wg. Mazzocca i wsp., 2010)

1. Pobrany szpik ostrożnie nawarstwiano na 17,5% roztwór sacharozy w proporcji 10 ml szpiku na 15 ml sacharozy (Sigma) w 50 ml probówkach typu falcon.
2. Wirowano przez 5 min z prędkością 1500 rpm w temperaturze pokojowej.
3. Po zwirowaniu otrzymywano cztery frakcje (ryc. 10), delikatnie zbierano frakcję zawierającą komórki mezenchymalne i wysiewano do odpowiednich naczyń hodowlanych.
4. Szalki z komórkami inkubowano w 37°C w 21% O₂. Po pierwszej wymianie medium można było zaobserwować pojedyncze wrzecionowate komórki mezenchymalne, kolejne wymiany pożywki odbywały się co 2-3 dni.



Ryc. 10. Izolacja mezenchymalnych komórek macierzystych metodą sacharozową. Próbkę szpiku nawarstwiono bezpośrednio na roztwór 17,5% sacharozy (A) Rozdział faz po 5 minutowym wirowaniu (B).

III. Procedura izolacji mezenchymalnych komórek macierzystych metodą wysiewania całej frakcji szpiku

1. Ta standardowa metoda polega na wysiewaniu całej pobranej od pacjenta frakcji szpiku kostnego bezpośrednio do naczynia hodowlanego w pożywce dla komórek BM-MSC Lonza.
2. Następnie po 48 godzinach inkubacji pozostawiano jedynie komórki przyklejone i dalszą hodowlę prowadzono jak w metodzie opisanej powyżej.

4. METODY BADAŃ

4.1. Hodowla ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych

Wszystkie wyizolowane komórki MSC hodowano w komercyjnie dostępnej pożywce do hodowli ludzkich komórek MSC (MSCGM BulletKit™, Lonza). Hodowlę prowadzono w standardowych warunkach (21% stężenie tlenu, 5% CO₂ o wilgotności 95% i temperaturze 37°C). Dwa lub trzy razy w tygodniu wymieniano połowę objętości pożywki. Na etapie 70%-80% konfluencji komórki po inkubacji z Trypsyną 5 min, w 37°C (0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA) przesiewano do nowych naczyń hodowlanych tak, aby utrzymać stały poziom proliferacji. Pasażowane komórki wysiewano w gęstości 2-5.000/cm² i pobierano wg. szczegółowego schematu do dalszych eksperymentów. W celu zbadania ekspresji genów na poziomie mRNA lub białek, próby komórkowe były pobierane w różnych punktach czasowych i dalej poddawane procedurze opisanej w kolejnych punktach Metod.

4.2. Zastosowanie warunków obniżonego stężenia tlenu

Standardowo rekomendowane do hodowli MSC warunki atmosferyczne zawierające mieszaninę 21% tlenu i 5% CO₂ na etapie 2-3 pasażu zmieniono na zawierające zarówno tlen jak i CO₂ w równych stężeniach 5%. Hodowle te oznaczano akronimem WJ-MSC_{NT}, BM-MSC_{NT}. W odpowiednich punktach czasowych (2 tygodnie, 1 miesiąc, 2 miesiące) pobierano materiał do analizy ekspresji genów i białka. Przeprowadzono analizę zmian fenotypów oraz proliferacji.

4.3. Weryfikacje fenotypu mezenchymalnego metodą cytometrii przepływowej

Analiza obecności cząsteczek powierzchniowych na komórkach MSC została przeprowadzona przy użyciu komercyjnego zestawu przeciwciał do identyfikacji ludzkich komórek MSC (BD Stemflow™ hMSC Analysis Kit). Komórki MSC na etapie 2-3 pasażu odklejano poprzez potraktowanie Akutazą a następnie zawieszano w zimnym buforze BD Pharmingen™ w gęstości 1x10⁶ komórek/ml. Do zawiesiny komórek MSC dodawano odpowiednie przeciwciała skierowane przeciwko markerom pozytywnym CD90, CD73, CD105, oraz negatywnym CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR dla tej populacji sprzężone z odpowiednim fluorochromem (FITC-izotiocyjanianem fluoresceiny, PerCP-Cy5.5, APC, PE-fikoerytryną). Próbkę inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 30 minut. W

celu wykluczenia niespecyficznego reakcji zastosowano odpowiednie izotypy przeciwciał IgG1/IgG2. Zawiesinę komórek mezenchymalnych oceniano w cytometrze przepływowym Facs Calibur firmy Becton Dickinson, analizując 100.000 komórek w jednej próbce. Dla każdej próbki analizowano 10000 zliczeń za pomocą oprogramowania FACSDiva. Wyniki wyrażono, jako procent komórek pozytywnych w stosunku do izotypowo dopasowanej kontroli negatywnej przeciwciała na obrazie histogramu.

4.4. Ocena zdolności MSC do różnicowania w kierunku komórek mezodermy (osteocyty, chondrocyt, adipocyty)

Jednym z kryteriów identyfikacji wyizolowanych populacji MSC była ocena zdolności do różnicowania w inne komórki pochodzące z mezodermy t.j. adipocyty, chondrocyty oraz osteocyty w warunkach hodowli *in vitro*.

Badanie adipogenezy

Różnicowanie w kierunku adipocytów zostało przeprowadzone w komercyjnie dostępnym medium do indukcji adipogenezy (Gibco). Komórki na etapie 2/3 pasażu wysiewane były w początkowej gęstości 1×10^4 komórek/cm² na 24 dołkowe płytki, następnie po uzyskaniu odpowiedniej konfluencji umieszczane w medium różnicującym w standardowych warunkach przez 14 dni.

Barwienie na obecność kropli tłuszczu

Powodzenie procesu różnicowania w komórki tkanki tłuszczowej oceniano obecnością kropli tłuszczu, które intensywnie barwią się w reakcji z roztworem czerwieni olejowej, która jest wiązana przez triglicerole. Zróżnicowane komórki MSC w 24 dołkowej szalce zostały poddane utrwalaniu w 4% PFA. Po upływie 30 minut komórki przemywano wodą destylowaną oraz 60% roztworem izopropanolu, który następnie dokładnie usuwano. Kolejno do każdego dołka dodano roztworu czerwieni olejowej (3 mg/ml w mieszaninie izopropanol/woda 3:2). Po 5 minutach inkubacji komórki przepłukano dokładnie wodą. Etap płukania powtórzono trzykrotnie. Uzyskane preparaty analizowano w mikroskopie świetlnym.

Badanie osteogenezy

Badanie różnicowania MSC w kierunku osteocytów prowadzono w komercyjnie dostępnym medium (Gibco). Komórki z tego samego pasażu hodowli *in vitro* wysiewane były w początkowej gęstości w 5×10^3 komórek/cm² na 24 dołkowe szalki. Po około 3 tygodniach

indukcji w medium różnicującym pozytywną reakcję charakteryzowano na podstawie produkcji soli wapnia rozpoznawanych barwieniem z czerwienią alizarynową.

Barwienie Alizarin Red na obecność soli wapnia

Komórki MSC utrwalano w 4% PFA przez 30 minut, przemywano dejonizowaną wodą a następnie inkubowano przez 2-3 minuty z 2% roztworem Alizarin Red S (Sigma-Aldrich). Po tym czasie preparaty intensywnie przemywano wodą dejonizowaną w celu usunięcia niespecyficzną precypitatów. Następnie uzyskane preparaty analizowane były w mikroskopie świetlnym. Czerwone wewnątrzkomórkowe zbarwienie świadczyło o produkcji soli wapnia przez zróżnicowane komórki.

Badanie chondrogenyzy

Różnicowanie w kierunku komórek tkanki chrzęstnej prowadzono powyżej 14 dni, wysiewając komórki w bardzo dużej gęstości w postaci struktur trójwymiarowych tzw. mikromasach (>5x10⁵ komórek/5 µl). Komórki przylegające trypsynizowano (5 min., 37°C) a następnie wirowano przez 3 minuty przy prędkości 1000 rpm. Dokładnie zbierano nadsącz, gęstą zawiesinę komórek delikatnie rozbijano i nakraplano pojedyncze 5 µl krople na szalki 24 dołkowe. Tak powstałe mikrokrople suszono w inkubatorze przez około 30-60 min. następnie zalewano medium różnicującym (Gibco). Reakcję weryfikowano na obecność glikozaminoglikanów, barwiąc błękitem alcjanowym.

Barwienie błękitem alcjanowym na obecność glikozaminoglikanów

Utrwalone przy użyciu 4% PFA hodowle komórek przemywano roztworem PBS i inkubowano w temperaturze pokojowej z 1% roztworem Alcian blue (Sigma-Aldrich) w 0,1 N HCl. Po 30 minutach inkubacji próbki płukano trzy razy 0,1 N HCl w celu wyeliminowania niespecyficznego reakcji. Obecność zabarwionych na błękitno gwieździste rozchodzących się skupisk komórek świadczyła o pozytywnej reakcji.

We wszystkich testach różnicowania, jako kontrolę negatywną do reakcji barwnych wykorzystano komórki hodowane w standardowej pożywce wzrostowej pozbawionej czynników różnicujących.

4.5. Ocena zdolności do różnicowania w kierunku neuralnym

W celu indukcji różnicowania w kierunku neuralnym komórki WJ-MSK na etapie 3-4 pasażu wysiewane były w bardzo małej gęstości 500 komórek/cm² na 24 dołkowe szalki pokryte poli-L-lizyną. Następnie komórki hodowano w mediach zawierających w różnych

kombinacjach czynniki różnicujące przez kolejne 7 lub 14 dni. Dokładny skład mediów indukujących przedstawiono w tabeli 4.

Część doświadczeń przeprowadzono w obecności inhibitora deacetyazy histonowej Trichostatyny A (TSA) (Sigma-Aldrich). Stężony roztwór TSA przygotowano w bezpiecznych niecytotoksycznych stężeniach końcowych DMSO (< 2%). Do komórek dodawano TSA w dawce 200 nM, po 48 godz. poddawano działaniu czynników różnicujących. Dokładny skład mediów wykorzystanych do różnicowania neuralnego przedstawia tabela 4. Jako kontrolę zastosowano komórki z dodatkiem TSA hodowane w podstawowym medium do komórek MSC Lonza bez czynników indukujących oraz komórki poddane samym czynnikom różnicującym bez wcześniejszej suplementacji TSA.

Skład pożywek:

1. ITS (DMEM/F12, 2%FBS, insulinę-transferynę-selenian (ITS, 1:100, Gibco)
2. BAZA (DMEM/F12, suplement B27 (1:50, Gibco), EGF (20 ng/ml), AAS (1:100)
3. NIM (ang. *Neural Induction Medium*) - komercyjne medium (Gibco)
4. NEM (ang. *Neural Ekspansjon Medium*) - komercyjne medium (Gibco)

Stężenia suplementów: B27 (1:50, Gibco), bFGF (20 ng/ml), N2 (1%), RA (1 μ M.), dBcAMP (500 μ M), BDNF (20 ng/ml)

Tabela 4. Skład mediów wykorzystanych w protokole do różnicowania neuralnego MSC

Medium podstawowe	+suplement	Czas indukcji	Neuralny Fenotyp komórek bez TSA	Neuralny/Fenotyp komórek z TSA
DMEM/F12 +10% FBS	+ 2% DMSO	14 DIV	-	
DMEM/F12 +10% FBS	+ dBcAMP	14 DIV	-	+/-
DMEM/F12 +10% FBS	+ RA+BDNF	14 DIV	-	
DMEM/F12 +10% FBS	+BDNF + RA+dBcAMP	14 DIV	-	+
ITS	+ 2% DMSO	14 DIV	-	
ITS	+ dBcAMP	14 DIV	-	+/-
ITS	+ RA+BDNF	14 DIV	-	
ITS	+BDNF + RA+dBcAMP	14 DIV	-	+/-
Baza		7DIV	-	
Baza	+N2 +bFGF	7DIV	-	
Neurobasal	+B27+N2	7DIV	-	
Neurobasal	+ B27+ N2+ bFGF	7DIV	-	
NIM		14 DIV	-	
NEM		14 DIV	-	
NIM/NEM		7/14DIV	-	

(-) - zastosowane warunki doświadczenia nie wykazały zmian w morfologii traktowanych komórek

(+) - zaobserwowano charakterystyczną zmianę fenotypu traktowanych komórek

(+/-) - nieznaczna zmiana fenotypu traktowanych komórek

Na czerwono zaznaczono wariant eksperymentalny, który jako jedyny wpływał korzystnie na różnicowanie neuralne komórek MSC, pozostałe niezaznaczone warianty powodowały zbyt dużą śmiertelność.

4.6. Badanie proliferacji komórek MSC

Szybkość proliferacji komórek była mierzona za pomocą trzech testów: z zastosowaniem odczynnika WST-1, poprzez obliczanie czasu podwojenia populacji (PDT) oraz barwieniem immunocytochemicznym na obecność białka Ki67.

4.6.1. Kolorymetryczna metoda z zastosowaniem odczynnika WST1

Metoda ta polega na pomiarze redukcji nieznacznie zabarwionych lub bezbarwnych soli tetrazolu do intensywnie zabarwionych pochodnych formazanu. Proces ten wymaga utrzymania stałej równowagi oksydo/redukcyjnej i tym samym jest zależny od metabolizmu energetycznego komórek i prawidłowej produkcji związków wysokoenergetycznych przez mitochondria. Za pomocą czytnika spektrofotometrycznego FLUOstar Omega (Biogenet) została wykonana wzorcowa krzywa kalibracyjna zależności absorbancji ($\lambda = 420$ nm) od gęstości badanych komórek w stosowanych warunkach pomiarowych. Komórki z tego samego etapu hodowli wysiewano w ilości $1,5 \times 10^3$ komórek/cm² na płytce 96 dołkowe, następnie każdego dnia do odpowiednich dołków dodawano odczynnik WST-1 w proporcji 1/10. Po 2 godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C dokonywano pomiaru mierząc absorbancje przy długości fali 420 nm. Poziom absorbancji w oparciu o sporządzoną krzywą wzorcową był przeliczany na liczbę żywych komórek MSC w hodowli.

4.6.2. Metoda obliczania czasu podwajania populacji (PDT)

W drugiej metodzie w celu porównania szybkość proliferacji komórek MSC opierano się na obliczeniach czasu podwajania populacji komórek (PDT; ang *Population Doubling Time*). W trakcie każdego pasażu zbierano komórki na etapie tej samej konfluencji liczone i ponownie wysiewano w stałej gęstości początkowej 3×10^3 komórek/cm². Liczba PDT (czas podwajania populacji) została obliczona w odniesieniu do całkowitej liczby komórek stosując wzór:

$$(t - t_0) \cdot \log 2 / \log (N - N_0),$$

gdzie: t - t₀ oznacza czas hodowli (dni),

N końcową liczbę komórek i N₀ jest liczbą komórek wysianych

4.6.3. Immunocytochemiczna analiza ekspresji białka Ki-67

Proliferację komórek określano poprzez analizę barwienia immunofluorescencyjnego z przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko Ki-67. Ki-67 jest białkiem jądrowym, którego ekspresja jest ściśle związana z aktywnością cyklu komórkowego. Komórki wysiewano na 24-dołkowych płytkach hodowlanych pokrytych polilizyną stałej gęstości 4×10^3 komórek/cm², a następnie po 2-3 dniach utrwalono 4% PFA. W celu oceny proliferacji zliczano minimum 100 komórek w 5 losowych polach w trzech niezależnych eksperymentach, a następnie obliczano procent komórek Ki6-7 pozytywnych wśród wszystkich jader komórkowych.

4.6.4. Pomiar powierzchni komórek

Pomiaru wielkości komórek MSC dokonano z wcześniej wykonanych zdjęć obrazów mikroskopowych za pomocą oprogramowania AutoCad 2010. Pomiarów dokonano z przynajmniej 20 niezależnych zdjęć wykonanych w tym samym powiększeniu i skali dla każdego etapu hodowli komórek dla WJ-MSC (n=6), dla BM-MSC (n=4).

4.7. Analiza ekspresji genów na poziomie mRNA

4.7.1. Izolacja całkowitego RNA

Izolację RNA przeprowadzano stosując zmodyfikowaną metodę Chomczyńskiego i Sacchi (1987). Całkowite RNA z hodowli komórkowych izolowano przy użyciu odczynnika TRIZOL Reagent (Life Technology) zgodnie z instrukcją producenta. Następnie spektrofotometrycznie przy użyciu NanoDrop 2000 określano stężenie oraz czystość wyizolowanego kwasu nukleinowego, odczytując wartości stosunku absorbancji przy 260 nm i 280 nm oraz 260 nm do 230 nm. Do dalszych badań używano próbki RNA o czystości około 2.0. Otrzymane RNA poddano procesowi DNazowania w celu usunięcia ewentualnych zanieczyszczeń genomowym DNA. W tym celu wykorzystano zestaw odczynników Ambion's DNA-free™ DNase Treatment and Removal Reagents (Life Technologies) zawierający DNazę oraz 10 x stężony bufor, reakcję prowadzono w objętości 50 µl zgodnie z zaleceniami producenta.

4.7.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT)

Do reakcji odwrotnej transkrypcji (RT, ang. *Reverse Transcription*) wykorzystano zestaw odczynników High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Life technologies) w warunkach zalecanych przez producenta. Skład mieszaniny reakcyjnej zamieszczono w tabeli 5.

Tabela 5. Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji RT

Nazwa odczynnika	Objętość
2x RT Buffer	10 μ l
20x RT Enzyme Mix	1 μ l
Woda	9 μ l -x
RNA	X μ l (0,5 μ g-1 μ g)
Objętość całkowita	20 μ l

4.7.3. Reakcja PCR z zastosowaniem Taq PCR Core KIT (Qiagen)

Reakcję PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) przeprowadzono z zastosowaniem odczynników Taq PCR Core KIT (Qiagen) zgodnie z instrukcją producenta w objętości 10 μ l mieszaniny zawierającej 1U Taq DNA Polymerase, 200 μ M dNTPs i równą ilość cDNA (200-300 ng) dla każdego genu, z dodatkiem 0,1 μ M starterów w orientacji (F, *forward*) i (R, *reverse*). Sekwencje nukleotydowe analizowanych genów pobrano z bazy NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Startery do amplifikacji wybranych genów zaprojektowano przy użyciu programu primer - BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>) lub wykorzystano sekwencje dostępne w literaturze (Paczkowska i wsp. 2013). W miarę możliwości startery projektowano w ten sposób aby amplifikowany fragment zlokalizowany był w 2 oddzielnych eksonach. Sekwencje starterów podano w tabeli 6. Zaprojektowane startery zsyntetyzowano w firmie Sigma-Genosys.

4.7.4. Rozdział elektroforetyczny

Produkty reakcji PCR poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu w 1,5% żelu agarozowym (stosowano wysokorozdzielczą agarozę firmy Sigma) w 0,5 x stężonym buforze TBE (0,89 M Tris, kwas borowy, 0,02 M EDTA, pH8). Wykonano zdjęcia DNA wyznakowanego

bromkiem etydy, 0,5 mg/ml a obrazy rejestrowano w systemie do dokumentacji i wizualizacji żeli GELDoc firmy BioRad.

4.7.5. Reakcja qPCR w czasie rzeczywistym z zastosowaniem SYBR green PCR Master MIX

Pomiar ekspresji mRNA części analizowanych genów wykonano również przy pomocy metody PCR z zastosowaniem fluorescencyjnego barwnika SYBR Green (Applied Biosystems, Life technologies). PCR w czasie rzeczywistym (ang: *Real-time PCR*) polega na detekcji sygnału powstającego produktu PCR w czasie fazy wykładniczego wzrostu i odpowiada liczbie cykli, w której stężenie produktu proporcjonalne do fluorescencji przekracza linię tła tzw. punkt odcięcia (C_p , ang. *Crossing point*). Detekcja opiera się o właściwość barwnika SYBR Green, który łącząc się z dwuniciowym DNA emituje sygnał o długości fali 530 nm. Intensywność fluorescencji jest związana ze wzrostem ilości produktu w czasie trwania reakcji PCR i jest proporcjonalna do ilości powstającego produktu. Reakcję real-time PCR przeprowadzano w 96 dołkowych płytkach w 25 μ l objętości mieszaniny z zastosowaniem SYBRGreen PCR Master MIX (Applied Biosystems, Life Technologies) i specjalnie dobranych starterów według zaleceń producenta w termocyklerze 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Skład mieszaniny reakcyjnej umieszczony w tabeli poniżej.

Tabela 6. Skład mieszaniny do reakcji Real-time PCR

Nazwa odczynnika	Objętość
SYBR Green PCR Master Mix	12,5 μ l
Starter forward (50 nM)	1 μ l
Starter reverse (50 nM)	1 μ l
cDNA (100 ng)	10,5 μ l - X μ l
Woda wolna od nukleaz	X μ l
Objętość całkowita	25 μ l

Wydajność reakcji została wyznaczona dla każdego z badanych genów na podstawie sporządzonych krzywych standardowych serii pięciu kolejnych 10- krotnych rozcieńczeń w trzech powtórzeniach. Jako geny referencyjne stosowano geny konstytutywne metabolizmu podstawowego tj: dehydrogenazę aldehydu-3-fosfoglicerynowego (GAPDH) lub beta-aktynę (ACTB) oraz tubulinę B1 (TUBB1).

Normalizacja wartości ekspresji

Do wyznaczenia względnego poziomu ekspresji poszczególnych genów w badanych populacjach komórek zastosowano następujące wzory:

Równania stosowane do obliczenia metodą delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (Livak i Schmittgen 2001, Pfaffl 2001)

$$\Delta Ct = Ct_{(\text{genu badanego})} - Ct_{(\text{genu referencyjnego np. } \beta\text{-aktyny})}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{próby badanej})} - \Delta Ct_{(\text{kalibratora})}$$

Wyniki badań przedstawione zostały w postaci wartości stosunku

$$R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

W celu identyfikacji produktów niespecyficznych reakcji wykonano krzywą topnienia uzyskanych produktów PCR. Niespecyficzne krótsze sekwencje mają zdolność do topnienia w niższych temperaturach w porównaniu do specyficznych produktów reakcji PCR. We wszystkich analizowanych próbach po reakcji amplifikacji zaobserwowano jeden produkt.

Tabela 7. Lista starterów użytych w reakcji RT-PCR i reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym

Nazwa białka/ genu	Wielkość produktu reakcji PCR (pz)	Sekwencje primerów (5'→3')
ACTB	120	F:GCCAACCGCGAGAAGATGA R:CATCACGATGCCAGTGGTA
Nestyna	168	F:TGGCTCAGAGGAAGAGTCTG R:CCCCATTACATGCTGTGA
NF-200	829	F: GAGGAACACCAAGTGGGAGA R:AGGGAGAAAGCAGAAACAAGACA
MAP2	135	F:CTGCTTTACAGGGTAGCACAA R: TTGAGTATGGCAACCGGTCTG
NeuroD1	118	F: CGCTGGAGCCCTTCTTTG R: GCGGACGGTTCGTGTTG
GFAP	266	F:GCAGAGATGATGGAGCTCAATGACC R:GTTTCATCCTGGAGCTTCTGCCTCA

Oct3/4A	144	F: GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG R: CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC
Sox-2	224	F: ACACCAATCCCATCCACACT R: GCAAACCTTCTGCAAAGCTC
Rex-1	289	F: GCTGCCCTGAGAAAGCATCT R: GCGTTAGGATGTGGGCTTTC
Nanog	148	F: AATACCTCAGCCTCCAGCAGATG R: TGCCTCACACCATTGCTATTCTTC
CD73	241	F: CGCAACAATGGCACAATTAC R: CTCGACACTTGGTGCAAAGA
CD90	236	F: CTAGTGGACCAGAGCCTTCG R: TGGAGTGCACACGTGTAGGT
CD105	165	F: CACTAGCCAGGTCTCGAAGG R: CTGAGGACCAGAAGCACCTC
CD166	217	F: CGCAATGCAACAGGAGACTA R: GGCTAGATCGAAGCCTGATG
Wimentyna	170	F: GAGAACTTTGCCGTTGAAGC R: TCCAGCAGCTTCTGTAGGT
Kolagen	332	F: AGTGGTTACTACTGGATTGACC R: TTGCCAGTCTCCTCATCC
Fibronektyna	386	F: CTGGGATGCTCCTGCTGT R: CTGTTTGATCTGGACCTGCAG

Tabela 8. Lista starterów użytych reakcji RT-PCR i RT-PCR w czasie rzeczywistym

Nazwa białka/ genu	Wielkość produktu reakcji PCR (pz)	Sekwencja starterów	
		Forward	Reverse
EGF	85	F:GCAGAGGGATACGCCCTAAGT	R:CAAGAGTACAGCCATGATTCCAAA
CNTF	69	F:TGTGCGTGCTTGCATGTG	R:ACCCTGAAGTGGGAAGGACGTT
IGF-1	68	F:TGCTTCCGGAGCTGTGATCTA	R:GCTGACTTGGCAGGCTTGAG
HGF	151	F:GCCCTATTTCTCGTTGTGAAGGT	R:CTGTATCTCAAACCTAACCATCCATCCTATG
VEGF	136	F: GAGCCGCGAGAAGTGCTA	R: GCCTCACCCGTCCATGAG
NGF	147	F: GCAAGCGGTCATCATCCCAT	R: TGTTGTTAATGTTACCTCTCCC
GDNF	112	F: TGGCAGTGCTTCCTAGAAGAG	R: AAGACACAACCCCGGTTTTTG
GDNF	92	F:TTTAGGTAAGTGCAGCGGCTCTT	R:TCACTCACCAGCCTTCTATTTCTG
BDNF	80	F:ATTACAATCAGATGGGCCACATG	R:AGGGAGAAAGCAGAAACAAGACA
BDNF	168	F: GATGCTCAGTAGTCAAGTGCC	R: GCCGTTACCCACTCACTAATAC
EGF	85	F:GCAGAGGGATACGCCCTAAGT	R:CAAGAGTACAGCCATGATTCCAAA
NT4	168	F:TGCTTCCGGAGCTGTGATCTA	R:GCTGACTTGGCAGGCTTGAG

NT3	141	F:GGTACGCGGAGCATAAGAGTC R:GAGAGTTGCCCGTTTTGATCT
p75 ^{NTR}	109	F:CCTACGGCTACTACCAGGATG R:CACACGGTGTTCTGCTTGTC
GFR α 1	137	F:GTACAGGTCTGGCGTACATCAC R:AGCAGAAGAGCATTCCGTAGC
GFR α 2	195	F:AGCGCCAAGAGCAACCATT R:CATGCGGTAGGTGTACTIONCGA
TrkA	96	F:GTCAGCCACGGTGATGAAATC R: CAGCACGTCACGTTCTTCCT
TrkB	131	F:CTGGTGCATTCCATTCACTG R:CGTGGTACTCCGTGTGATTG
TrkC	96	F:TGGCTGGACTATGTGGGCT R:CAGCACGTCACGTTCTTCCT
GAPDH	73	F:CCACATCGCTCAGACACCCAT R:TGACCAGGCGCCCAATA
TUBA1B	101	F:GCCTCCTAATCCCTAGCCAC R:TCCAGGCAGTAGAGCTCCC

4.7.6. Analiza ekspresji HIF-1 α i HIF-2 α z zastosowaniem sond hybrydacyjnych TaqMan

W celu detekcji i analizy ekspresji HIF-1 α i HIF-2 α wykorzystano uniwersalne sondy hybrydujące TaqMan (Applied Biosystems, Life Technologies). Sondy zarówno dla genów HIF-1 α , HIF-2 α oraz referencyjnego ACTB zostały dopasowane do zaprojektowanych wcześniej starterów. Sondy HIF-1 α (Hs00153153_m1), HIF-2 α (Epas1) (Hs01026149_m1) i beta –aktyny ACTB (Hs01060665_g1) wybrano z bazy danych ze strony producenta. Na końcu 5' sondy znakowane były barwnikiem fluorescencyjnym fluoresceiną (FAM), na końcu 3' wygaszaczem (dark quencher) hamującym generowanie sygnału fluorescencyjnego. W

trakcie powstawania produktu PCR dzięki aktywności 5' egzonukleazowej polimerazy sonda jest degenerowana. Pozwala to na oddzielenie barwnika od wygaszacza i generowanie sygnału. Reakcje przeprowadzono przy użyciu zestawu odczynników TaqMan Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies). Skład mieszaniny reakcyjnej podano w tabeli 9.

Tabela 9. Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym

Nazwa odczynnika	Objętość
2X TagMan Gene Expression Master Mix	10 μ l
20X TagMan Gene Expression Assay	1 μ l
Woda	x μ l
cDNA (50 ng)	4 μ l
Objętość całkowita	20 μ l

4.8. Analiza immunocytochemiczna

W celu identyfikacji fenotypów otrzymanych komórek wykonano szereg reakcji immunocytochemicznych (ICC, ang. *Immunocytochemistry*). Przed wykonaniem reakcji komórki wysiane na 24 dołkowych szalkach zostały przepłukane roztworem PBS a następnie utrwalone 4% PFA rozpuszczonym w PBS. Na wyizolowanych populacjach komórek MSC z poszczególnych etapów hodowli, przeprowadzono analizę ICC stosując I-rzędowe przeciwciała specyficzne dla określonych markerów oraz przeciwciała II-rzędowe skoniugowane z fluorochromami (tabela 10 i 11). Wykonano reakcję z przeciwciałami znakującymi białka typowe dla komórek MSC (CD73, CD90) oraz vimentynę, fibronektynę, kolagen, białko charakterystyczne dla komórek o charakterze zarodkowym SSEA-4, TRA1-60 (ang. *Tumor Rejection Antigen*), Oct3/4 oraz markery dla neuronów o różnym stopniu dojrzałości i komórek glejowych: Nestyna (progenitory neuralne), NF-200 (marker młodych neuronów), TUJ-1 (późne neurony), β -tubulina III (późne neurony), GFAP (marker astrocytów oraz macierzystych komórek neuralnych). Przed inkubacją z pierwszym przeciwciałem, w przypadku białek znajdujących się wewnątrz komórki, przeprowadzano permeabilizację błon komórkowych 0,2% Triton X-100 przez 15 minut, a następnie blokowanie wiązań nieswoistych mieszaniną 10% surowicą kozią NGS w 1% surowicy bydlęcej BSA w temp. pokojowej przez godzinę. W przypadku antygenów powierzchniowych pominięto etap permeabilizacji błon komórkowych. Reakcje z przeciwciałami I-rzędowymi przeprowadzano inkubując komórki przez ok. 24 godz. w temperaturze 4°C. Dla rozwinięcia reakcji barwnych zastosowano odpowiednie II-rzędowe przeciwciała: anty-mysie IgG1 Alexa Fluor 546; anty-królicze

IgG(H+L) Alexa Fluor 546; anty-kozie IgG (H+L) Cy3; anty-mysie IgM Alexa Fluor 546. Jądra komórek barwiono 5 μ M Hoechst 33258 (Sigma) przez 25 min. Po końcowym płukaniu (etap powtórzony trzykrotnie) preparaty zostały zamknięte z użyciem Fluorescent Mounting Medium (Dako). Dla każdego przeciwciała wykonano kontrolę negatywną polegającą na reakcjach z pominięciem przeciwciał pierwszorzędowych. Wyniki uzyskane w badaniach immunocytochemicznych analizowano w mikroskopie konfokalnym LSM (Zeiss) oraz fluorescencyjnym Axioscope 2 z kamerą cyfrową AxioCam MRm (Zeiss).

Tabela 10. Przeciwciała pierwszorzędowe używane w badaniach immunocytochemicznych

PRZECIWCIAŁO GOSPODARZ	IZOTYP ROZCIEŃCZENIE	PRODUCENT
Monoklonalne anty-NF200 (mysz)	IgG1 1:400	Sigma
Monoklonalne anty- β -Tubulina III (TUJ1) (mysz)	IgG2a 1:1000	Covance
Poliklonalne anty-GFAP (królik)	IgG (H+L) 1:500	Cappel, Dako
Monoklonalne anty-Ki67 (mysz)	IgG1 1:400	Novacastra
Monoklonalne anty- Nestyna (mysz)	IgG1 1:300	Millipore
Monoklonalne anty-Kolagen (koza)	IgG (H+L) 1:200	Santa Cruz
Monoklonalne ant-Vimentyna (mysz)	IgG1 1:200	Dako
Monoklonalne anty-CD73 (mysz)	IgG3 1:200	Santa Cruz
Monoklonalne anty-CD90 (mysz)	IgG1 1:200	Santa Cruz
Monoklonalne anty-SSEA-4 (mysz)	IgG3 1:200	Millipore
Poliklonalne anty-Tra1-60 (mysz)	IgGM 1:100	Millipore
Monoklonalne anty-Fibronektyna (mysz)	IgG (H+L) 1:200	Dako
Monoklonalne anty-HIF-1 α (mysz)	IgG1 1:200	Abcam
Monoclonal anti-Tubulin III (mouse)	IgG2b 1:1000	Sigma
Monoclonal anti- α SMA (mouse)	IgG2a 1:200	Sigma

Tabela 11. Przeciwciała drugorzędowe wykorzystane w badaniach immunocytochemicznych

PRZECIWCIAŁO GOSPODARZ	FLUOROCHROM	IZOTYP/ ROZCIEŃCZENIE	PRODUCENT
Alexa Fluor kozie anty-mysie	Alexa 546	IgG (H+L) 1:1000	Molecular Probes
Alexa Fluor kozie anty-królicze	Alexa 546	IgG (H+L) 1:1000	Molecular Probes
Alexa Fluor kozie anty-mysie	Alexa 546	IgG1 1:1000	Molecular Probes
Alexa Fluor kozie anty-mysie	Alexa 488	IgG1 1:1000	Molecular Probes
Alexa Fluor kozie anty-mysie	Alexa 546	IgG2a 1:1000	Molecular Probes
Alexa Fluor kozie anty-mysie	Alexa 546	IgM 1:1000	Molecular Probes
kozie anty-królicze	Cy3	IgG (H+L) 1:1000	Jackson ImmunoRes

4.9. Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki przedstawiono jako wartości średnie z szeregu doświadczeń \pm odchylenie standardowe (\pm SD). Ilość powtórzeń zaznaczono w opisie rycin. W celu testowania statystycznej istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi przeprowadzono testy t-Studenta oraz analizę wariancji ANOVA i test Bonferroni. Do wszystkich obliczeń stosowano program GraphPad Prism6. Poziom istotności mniejszy niż $p < 0.05$ przyjęto za statystycznie znamienne.

5. WYNIKI

5.1. Ustalenie procedury otrzymywania, identyfikacja oraz optymalizacja warunków hodowli ludzkich komórek MSC pochodzących z tkanek popłodowych (WJ-MSC i UCB-MSC) oraz ze szpiku kostnego (BM-MSC)

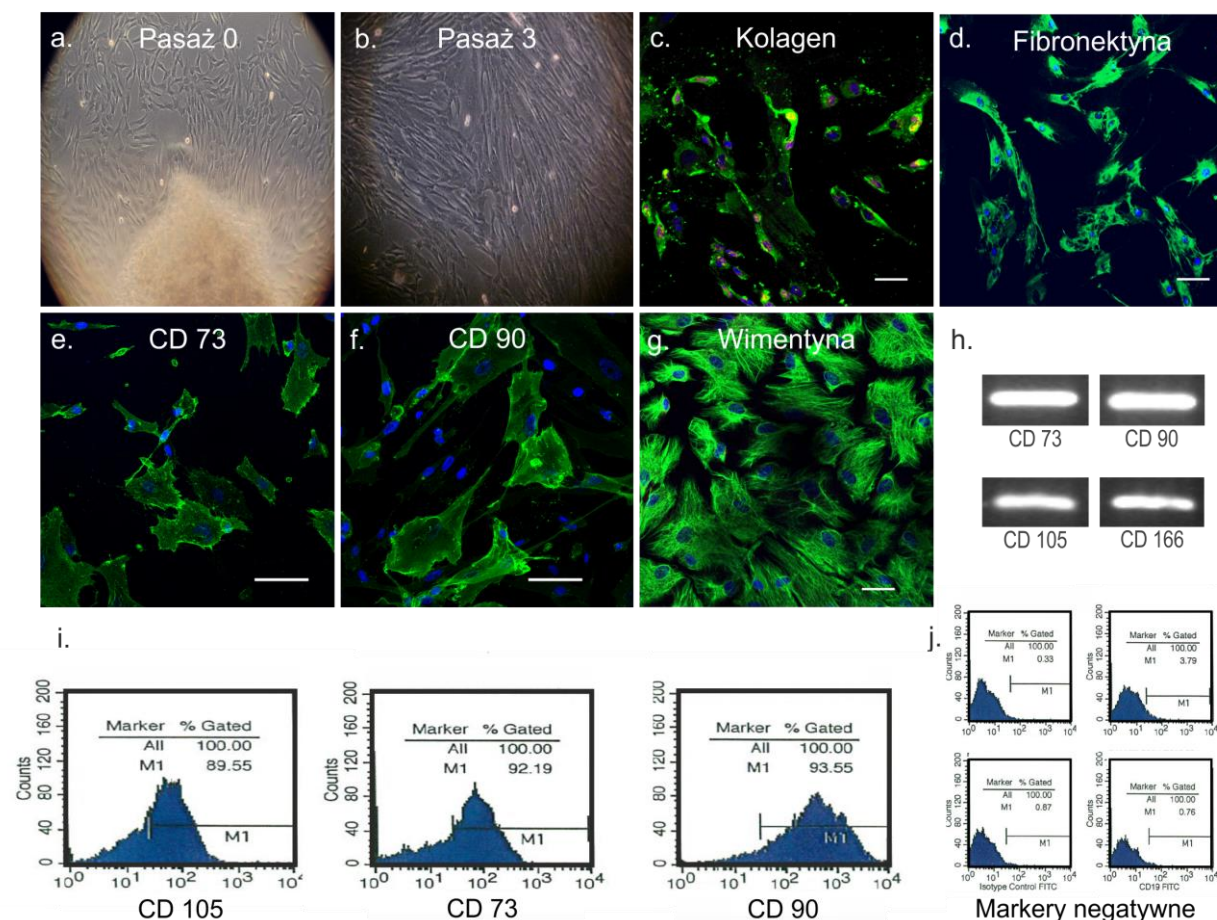
5.1.1. Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z galarety Whartona (WJ-MSC)

W pierwszej kolejności opracowano procedurę izolacji i hodowli komórek mezenchymalnych pochodzących z galarety Whartona sznura pępowinowego zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 3.1. Po około 7 dniach hodowli skrawków w środowisku 95% wilgotności, 5% CO₂ i 21% tlenu (warunki standardowe) obserwowano pierwsze migrujące, wrzecionowe komórki o fenotypie fibroblastycznym. Po usunięciu skrawków komórki te zasiedlały pozostałą wolną część powierzchni butelki hodowlanej, osiągając stan 70-80% konfluencji po około 14 dniach (pasaż 0). Następnie komórki były enzymatycznie odklejane od podłoża, liczone i przesiewane do nowych naczyń hodowlanych w gęstości 3x10³ komórek/cm². Spośród wszystkich 15 sznurów pępowinowych poddanych izolacji i obróbce mechanicznej wyizolowano typowe komórki mezenchymalne, co zostało potwierdzone w panelu badań przedstawionych poniżej (ryc. 11).

Do identyfikacji i charakterystyki komórek zastosowano metodę cytometrii przepływowej oraz immunocytochemiczną analizę antygenów powierzchniowych typowych dla komórek mezenchymalnych, potwierdzoną ekspresją genów markerowych metodą RT-PCR. Nie zaobserwowano różnic w ekspresji markerów mezenchymalnych pomiędzy komórkami z wczesnych etapów hodowli aż do pasaży 5-7, dlatego też przedstawione wyniki potraktowano jako reprezentatywne w obrębie tej całej populacji WJ-MSC.

Metodą cytometrii wykazano, że komórki izolowane z galarety Whartona wykazują na swojej powierzchni wysoki poziom ekspresji specyficznych powierzchniowych markerów dla tej grupy m.in. CD73, CD90, CD105 (powyżej 90% dla każdego z badanych antygenów) (ryc. 11). Nie zidentyfikowano obecności antygenów stosowanych rutynowo jako negatywne dla frakcji komórek mezenchymalnych: CD14, CD19, CD34, CD45 oraz HLA-DR. W dalszej kolejności, weryfikując mezenchymalny fenotyp otrzymanych frakcji WJ-MSC potwierdzono obecność transkryptów genów kodujących białka CD73, CD90, CD105 oraz CD166. Również barwienia immunocytochemiczne potwierdziły obecność tych antygenów na powierzchni komórek jak i innych białek charakterystycznych dla komórek mezenchymalnych. Były to białka cytoszkieletowe należące do filamentów pośrednich - wimentyna obecna w WJ-MSC

na różnych etapach hodowli, jak też białka kolagenu i fibronektyny, stanowiące ważny składnik macierzy zewnątrzkomórkowej syntetyzowanej przez komórki zrębu (ryc. 11).



Ryc. 11. Fenotypowa charakterystyka populacji komórek mezenchymalnych wyizolowanych z galerety Whartona (WJ-MSC). Obraz z mikroskopu świetlnego pokazuje fibroblastyczną morfologię otrzymanych komórek na etapie wczesnego (pasaż 0) oraz późniejszego pasażu (pasaż 3). WJ-MSC wykazują charakterystyczną dla fenotypów komórek mezenchymalnych ekspresję antygenów powierzchniowych. Immunocytochemiczna analiza ekspresji markerów mezenchymalnych CD73 (e) i CD90 (f) kolagen (c) oraz wimentyna (g) i fibronektyna (d). Jądra komórkowe wybarwiono Hoechst 33258 (niebieski). Skala 50 μ m. Poniżej: Reprezentatywne histogramy analizy cytometrycznej powierzchniowych markerów mezenchymalnych pozytywnych (i) oraz markerów negatywnych (j). Analiza RT-PCR ekspresji genów CD73, CD90, CD105, CD166 (h).

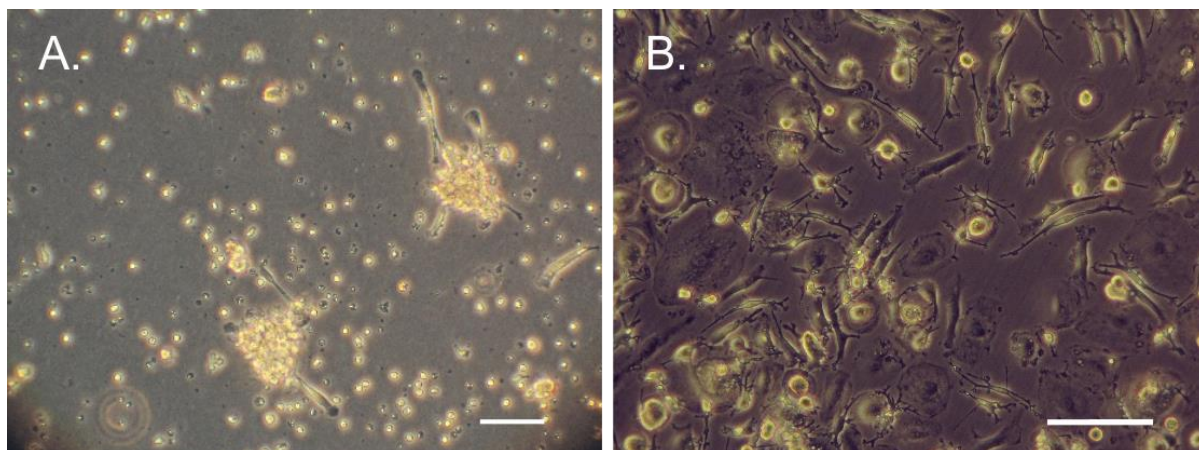
Analiza ekspresji markerów o charakterze pluripotencjalnym (Oct3/4 A, Sox2, Rex1 Nanog) w wyizolowanej populacji komórek WJ-MSC nie wykazała ich obecności na poziomie mRNA i białka. Materiał do izolacji RNA pobierany był z komórek hodowanych standardowo w warunkach 21% O₂ i 95% wilgotności w hodowli jednowarstwowej na etapie wczesnego (p1) i późniejszego pasażu (p3). Zgodnie z aktualnymi zaleceniami przygotowania matrycy mRNA, wykluczającymi udział pseudogenów, interesującym wynikiem była obserwacja braku ekspresji genu Oct3/4A, jak również pozostałych genów pluripotencjalności (Sox2, Rex1,

Nanog) (wyniki zbiorcze - ryc. 32) w hodowli WJ-MSC z wyjątkiem jej sporadycznej detekcji w materiale pochodzącym bezpośrednio z fragmentów galarety Whartona wraz z komórkami .

5.1.2. Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z krwi pępowinowej (UCB- MSC)

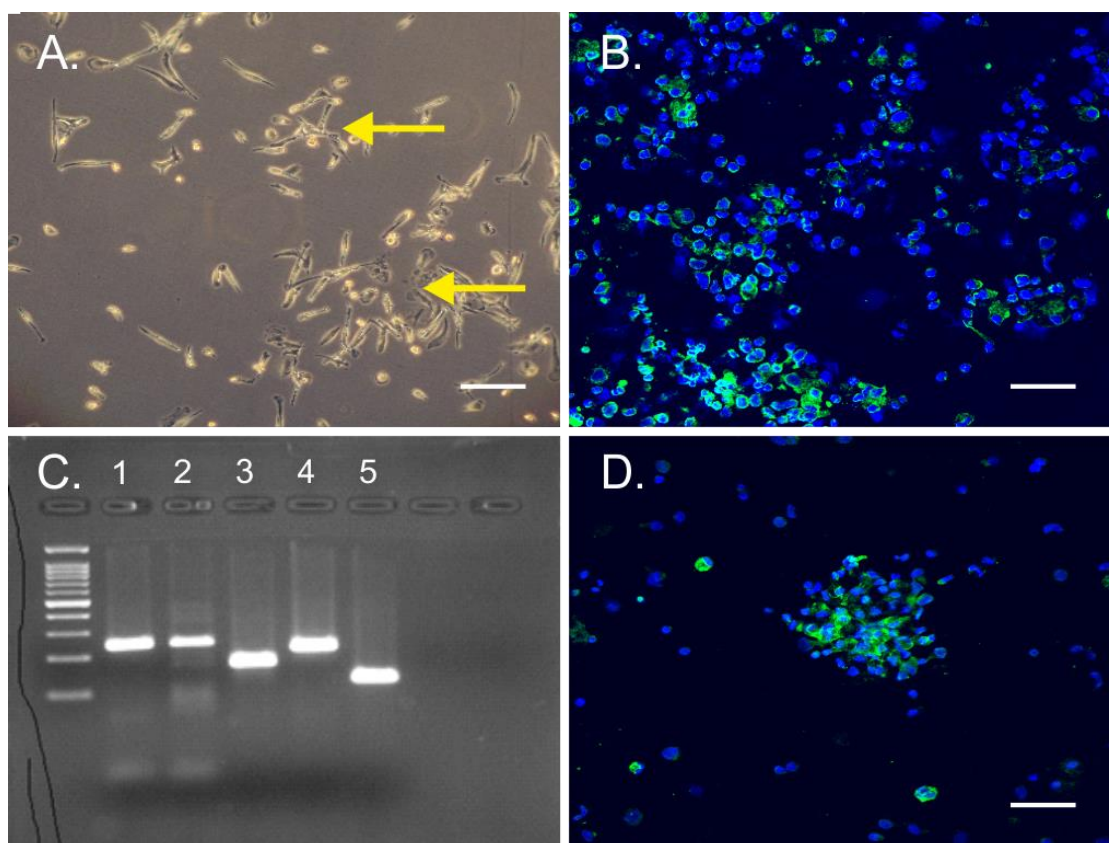
W dalszych badaniach starano się zoptymalizować metodę izolacji i hodowli komórek MSC pochodzących z ludzkiej krwi pępowinowej opartą na selekcji z wykorzystaniem komercyjnego zestawu przeciwciał RosetteSep (dokładny opis w rozdziale 3.2). Ze względu na stosunkowo niewielką liczbę komórek MSC we krwi pępowinowej oraz przyjęte trudne kryteria dotyczące materiału wyjściowego (czas izolacji komórek MSC do 6 godz, jak również objętość jednostki krwi pępowinowej powyżej 60 ml) (Zhang i wsp., 2011) wykazano, że krew pępowinowa jest niewspółmiernie trudniejszym materiałem wyjściowym do izolacji komórek MSC reprezentującym tkanki niedojrzałe. Otrzymane wyniki badań wykazały, że krew pępowinowa zawiera znacznie mniej MSC niż szpik kostny i galareta Whartona (podsumowanie - tabela 12) co powoduje trudności w izolacji i późniejszej hodowli MSC *in vitro*. W początkowej fazie izolacji komórek MSC z wyselekcjonowanej frakcji komórek jednojądrzastych - MNC krwi pępowinowej (zestaw przeciwciał RosetteSep) uzyskiwano wysoce heterogenną populację komórek, w której przeważały różnego rodzaju komórki prekursorowe, będące na różnych etapach rozwoju. Następnie w trakcie prowadzonej hodowli (zależnie od izolacji około 7-14 dni) uzyskiwano populację komórek przylegających o zróżnicowanej morfologii. Jednak pomimo zastosowania się do wszystkich wytycznych niezbędnych do uzyskania MSC nie udało się wyizolować jednolicie homogennej frakcji mezenchymalnych komórek macierzystych, pozwalającej na długoterminową analizę hodowli. Aby zoptymalizować warunki izolacji i selekcji komórek MSC przeprowadzono analizę w pożywkach o różnym składzie, dodatkowo wykorzystano suplementację w postaci zwiększonej zawartości surowicy płodowej FBS (ang. *Fetal Bovine Serum*) o stężeniu 20%-30% oraz glutaminy w połączeniu z zastosowaniem różnych pożywek podstawowych takich jak DMEM, α -MEM, DMEM/F12. W początkowym etapie hodowli, komórki MNC wysiewane w dużych gęstościach ($>10^6/\text{cm}^2$) wykazywały samoistną zdolność do tworzenia pływających agregatów, które po około tygodniowej hodowli osiadały na podłoże hodowlane i zaczynały tworzyć skupiska, z których migrowały na zewnątrz komórki adherentne (ryc. 12). Jednak w trakcie dalszej hodowli i w większości prób izolacji dominowały heterogenne populacje, w których zaobserwowano tylko pojedyncze fibroblasto - podobne komórki MSC. Adherentne komórki wykazywały duże zróżnicowanie w obrębie morfologii, ponieważ oprócz nielicznych komórek o fenotypie MSC dominowały dwie postaci innych rodzajów komórek: większe, okrągłe makrofagopodobne oraz mniejsze szpileczkowate o wrzecionowatym kształcie (ryc.12). W

trakcie trwania hodowli zaczynały dominować komórki makrofagopodobne, które w przeciwieństwie do komórek wrzecionowatych nie reagowały na działanie enzymatyczne trypsyny, pozostawały przyklejone do podłoża, a ich potencjał do wzrostu był znacznie ograniczony. Ten rodzaj hodowli pozwolił na wyodrębnienie i analizowanie komórek mezenchymalnych, jednak z powodu ich niewielkiego tempa proliferacji nie powiodło się przeprowadzenie ich dalszych analiz.



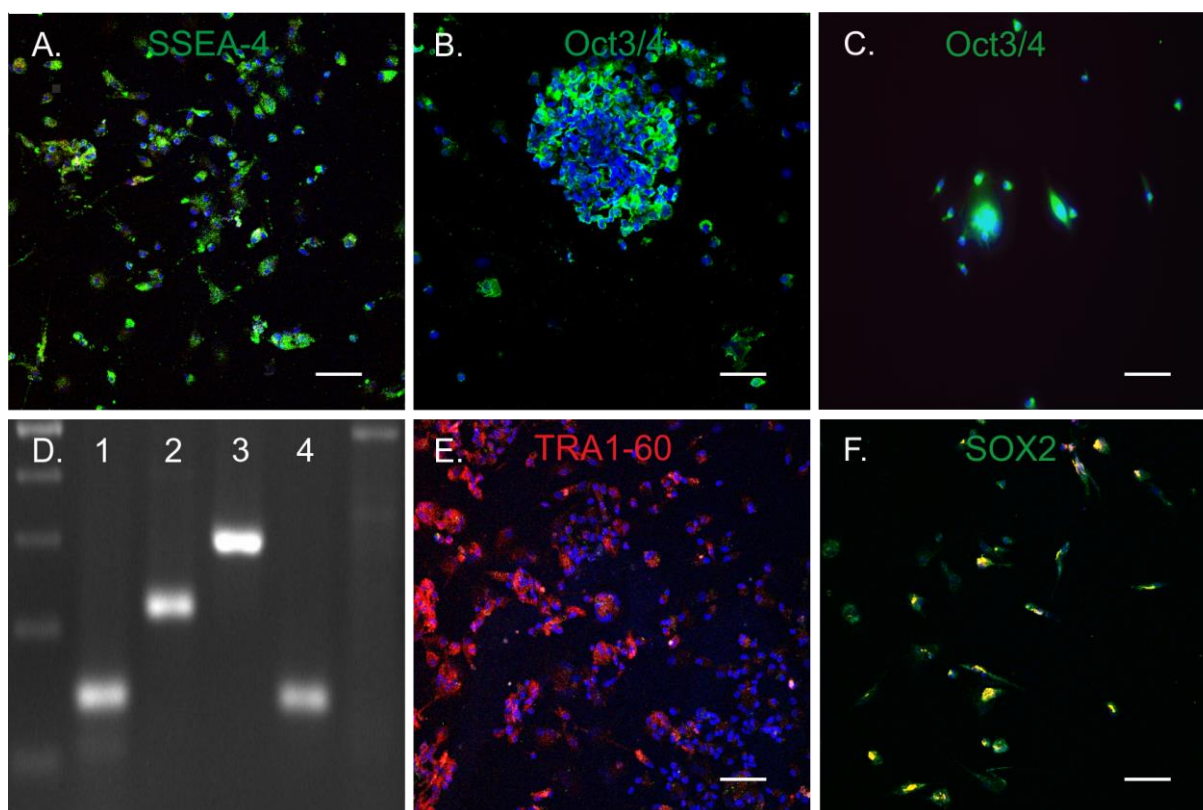
Ryc. 12. Hodowla pierwotna komórek jednojądrzastych izolowanych z krwi pępowinowej (MNC). Obraz z mikroskopu świetlnego w świetle przechodzącym. Frakcja komórek MNC po 7 dniach hodowli *in vitro*: osiadłe agregaty tworzące skupiska przyklejonych komórek (A) heterogenny obraz komórek adherentnych, charakterystyczny dla większości hodowli po 2 tygodniach (B). Skala 50 μm .

W dalszej analizie oceniano fenotyp mezenchymalny otrzymanej frakcji z komórek jednojądrzastych krwi pępowinowej. Dlatego w kolejnych eksperymentach podjęto próbę weryfikacji ich cech mezenchymalnych na podstawie ekspresji specyficznych markerów CD. W przeprowadzonych badaniach metodą barwienia immunocytochemicznego wykazano obecność komórek pozytywnych pod względem antygenów powierzchniowych CD73 oraz CD90 (ryc.13). Ze względu na wysoką heterogenność otrzymanych populacji, zidentyfikowana frakcja pozytywna pod względem markerów mezenchymalnych stanowiła niewielki odsetek w stosunku do wszystkich komórek jednojądrzastych. Ocenę fenotypu mezenchymalnego wśród komórek pochodzących z krwi pępowinowej potwierdzono na poziomie mRNA odnotowując tu ekspresję genów dla CD73, CD90, CD105 oraz CD166 (ryc.13).



Ryc. 13. Fibroblastyczna morfologia komórek uzyskanych z frakcji komórek jednojądrzastych MNC krwi pępowinowej (A). Analiza ICC wykazała obecność zgrupowań komórkowych pozytywnych pod względem antygenów powierzchniowych typowych dla komórek mezenchymalnych CD73 (zielony) - B oraz CD90 (zielony) - D. Jako marker jądrowy zastosowano barwnik Hoechst 33258 (niebieski). Skala 50 μm . Analiza RT-PCR wykazała ekspresję genów markerowych komórek MSC: CD73 (1), CD90 (2), CD105 (3), CD166 (4) wyrażone w stosunku do genu referencyjnego β -aktyny - ACTB (5). Strzałki wskazują na komórki o wrzecionowatym-fibroblastycznym kształcie w populacji MNC.

Podczas dalszej charakterystyki wyizolowanej frakcji komórek krwi pępowinowej wykazano w nich ekspresję genów pluripotencjalnych Oct3/4, Sox2, Rex1, Nanog. Ekspresję genów można było zaobserwować w świeżo wyizolowanych komórkach, a następnie w zależności od metody prowadzenia hodowli, w wyselekcjonowanej frakcji komórek przylegających nawet do drugiego tygodnia hodowli (pasaż 1-2) (ryc. 14). Jako kontrolę pozytywną wykorzystano mRNA pochodzące z zarodkowych komórek macierzystych (ESC, ang. *Embryonic Stem Cells*). Analiza immunocytochemiczna komórek wyizolowanych z krwi pępowinowej ujawniła w nich również subpopulację komórek charakteryzującą się obecnością pluripotencjalnych czynników transkrypcyjnych na poziomie białka. Wyróżniono tu komórki pozytywne pod względem antygenu Oct3/4, białko widoczne w osiadłych agregatach oraz w pojedynczych wyselekcjonowanych komórkach. Obecna również była ekspresja Sox2, TRA1-60 i SSEA-4 (ryc. 14).



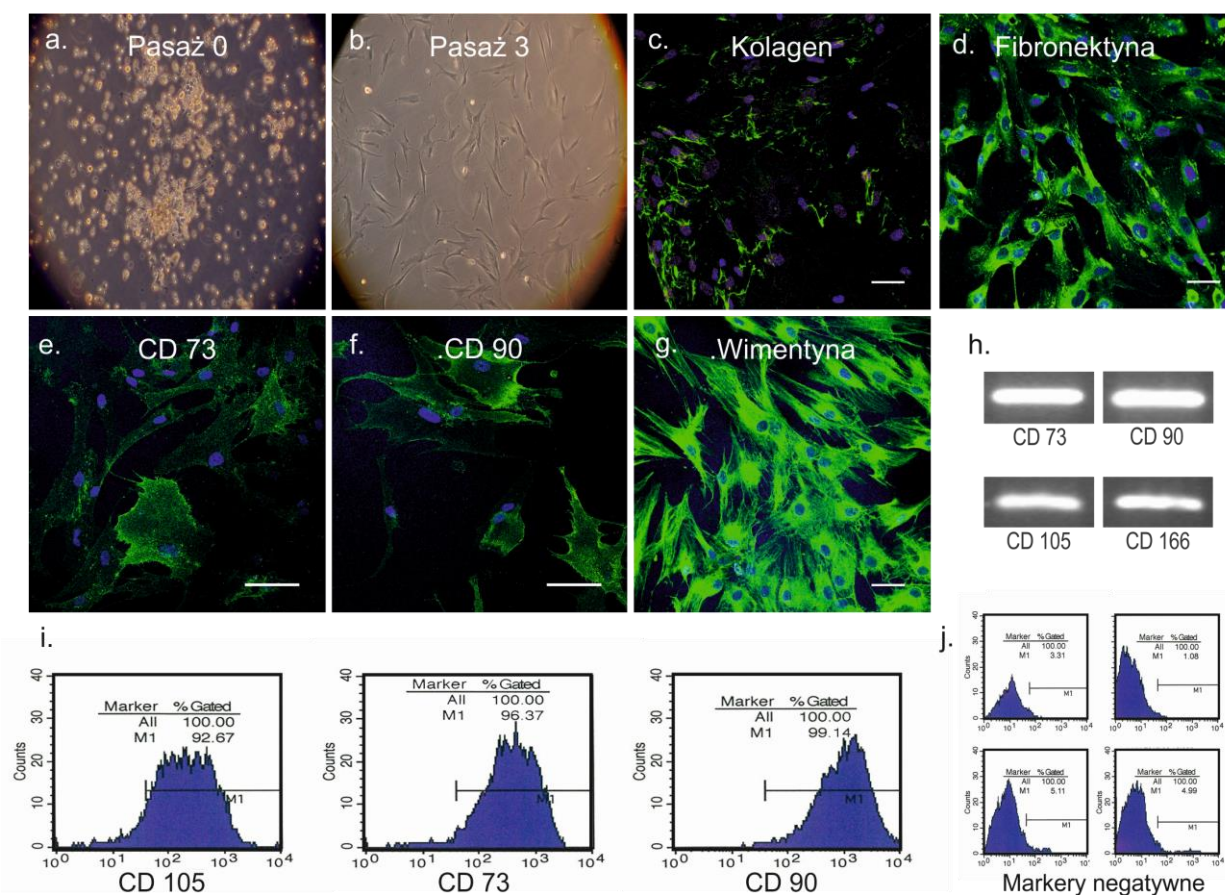
Ryc. 14. Charakterystyka populacji komórek jednojądrzastych MNC krwi pępowinowej wyizolowanych metodą selekcji negatywnej (RosetteSep) opisanej w rozdziale 3.2. Produkty reakcji RT-PCR dla mRNA genów pluripotencjalnych (D): Oct3/4 (1), Sox2 (2), Rex (3) Nanog (4) w komórkach MNC - reprezentatywne zdjęcie żelu z 7 dnia hodowli. Jako gen referencyjny została wykorzystana β -aktyna (ACTB). Immunocytochemiczna analiza pluripotencjalnych czynników transkrypcyjnych w komórkach MNC na etapie wczesnej jednowarstwowej hodowli-pasaż 1 w dniu 7. MNC krwi pępowinowej pozytywne pod względem białek pluripotencjalnych SSEA-4 (A), Oct3/4 (B,C), TRA1-60 (E) oraz Sox2 (F). Skala 50 μ m.

5.1.3. Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego (BM-MSC)

Kolejnym materiałem biologicznym analizowanym jako źródło komórek mezenchymalnych z tkanek dojrzałych był szpik kostny. Najlepszym antykoagulantem do pobierania i krótkoterminowego przechowywania szpiku okazał się roztwór heparyny. Spośród testowanych gradientów (sacharoza, percoll, fikol) za optymalną metodę izolacji szpikowych komórek jednojądrzastych MNC przyjęto wirowanie nawarstwowanego materiału na gradiencie fikolu o gęstości 1,77g/cm³. Tak otrzymane komórki jednojądrzaste wysiewano w ustalonej eksperymentalnie optymalnej gęstości 1-3 x 10⁶ komórek/cm² do naczyń hodowlanych, a następnie wykorzystując selekcję opierającą się na właściwościach adhezyjnych komórek, po około 48 godzinach trwania hodowli usuwano nieprzyklejone komórki. Po 10 dniach hodowli przylegających komórek MNC można było zaobserwować pojedyncze wrzecionowate komórki o fenotypie MSC, które dopiero po 2-3 tygodniach stawały się dominującymi i uzyskiwały 70-

80% konfluencji. Komórki MSC były enzymatycznie oddzielane od podłoża, liczone i wysiewane do dalszych eksperymentów w gęstości 3×10^3 komórek/cm². Na wydajność uzyskiwania jednowarstwowej hodowli BM-MSC znaczący wpływ miało miejsce, z którego pobrano materiał od dawcy. Szpik pochodzący z jamy szpikowej talerza biodrowego okazał się w badaniach wstępnych najbardziej wydajny.

W dalszych doświadczeniach podobnie jak w materiale izolowanym z galarety Whartona, wykazano wysoki procent komórek pozytywnych pod względem markerów mezenchymalnych. Zgodnie z przedstawionym obrazem immunocytochemicznym wyizolowana populacja komórek MSC ze szpiku kostnego charakteryzowała się obecnością antygenów powierzchniowych CD73 i CD90. Ponadto fenotyp mezenchymalny BM-MSC został potwierdzony w metodzie cytometrii przepływowej oraz analizą ekspresji genów metodą RT-PCR (ryc. 15).



Ryc. 15. Charakterystyka fenotypu populacji komórek mezenchymalnych otrzymanych ze szpiku kostnego (BM-MSC). Obraz z mikroskopu świetlnego pokazuje fibroblastyczną morfologię otrzymanych komórek BM-MSC na etapie inicjacji hodowli oraz późniejszego 3 pasażu. Komórki wykazują charakterystyczną dla fenotypów komórek mezenchymalnych obecność antygenów powierzchniowych. Immunocytochemiczna analiza obecności typowych markerów mezenchymalnych CD73 (e) i CD90 (f) oraz kolagen (c) wimentyna (g) i fibronektyna (d). Jądra komórkowe wybarwiono Hoechst33258 (niebieski). Skala 50 μ m. Poniżej: wykresy analizy cytometrii przepływowej powierzchniowych mezenchymalnych markerów pozytywnych w BM-MSC oraz markerów negatywnych (j) Analiza ekspresji dla genów CD73, CD90, CD105 oraz CD166 metodą RT-PCR (h).

Komórki BM-MSC począwszy od najwcześniejszych pasaży oraz na późniejszych etapach standardowej hodowli nie wykazywały ekspresji żadnego spośród badanych czynników transkrypcyjnych typowych dla komórek o charakterze pluripotencjalnym na poziomie mRNA i białka.

Podsumowując wyniki badań skupionych na ustaleniu optymalnych warunków otrzymywania ludzkich komórek MSC z różnych tkanek, najbardziej powtarzalnym i wydajnym źródłem do ich pozyskania okazała się galareta Whartona sznura pępowinowego. Ze wszystkich próbek poddanych preparatyce otrzymano komórki MSC (15/15), podczas gdy izolacja z krwi pępowinowej zakończyła się otrzymaniem pasażowanej hodowli MSC tylko w jednej próbce (1/15). W przypadku szpiku kostnego wykazano, że możliwe jest uzyskanie stosunkowo bogatej frakcji komórek MSC również ze wszystkich otrzymanych próbek (6/6). Porównując z WJ-MSC, które od początku etapu pasażu 1 wykazywały fibroblastyczną morfologię a 70-80% konfluencję osiągały w 10-15 dni od momentu izolacji, MSC ze szpiku kostnego do osiągnięcia tego etapu wymagały dłuższego czasu 15-20 dni z dużo większą przewagą heterogennych populacji w hodowli pierwotnej. W obu przypadkach, zdarzał się zróżnicowany obraz hodowli na wczesnych etapach, jednak fibroblastyczne komórki stopniowo dominowały hodowlę. Po pierwszej trypsynizacji hodowli pierwotnej w przeliczeniu na 15 skrawków umieszczonych w jednej butelce hodowlanej o powierzchni 25 cm² otrzymywano około 100.000 komórek MSC z galarety Whartona. Komórki MSC uzyskane z frakcji szpiku kostnego przeliczano na pierwotną liczbę wszystkich wysiewanych komórek jednojądrzastych. Wykazano, że z 10⁷ komórek MNC wysianych na szalkę o powierzchni 9,6 cm² można otrzymać około 20.000 BM-MSC w pierwotnej hodowli, którą można poddać dalszemu pasażowaniu. Zastosowana procedura preparatyki krwi pępowinowej umożliwiła otrzymanie najmniejszej liczby komórek MSC, stanowiącej jedynie około 5.000 na 10⁷ komórek jednojądrzastych, otrzymanych metodą gradientu gęstości z zestawem przeciwciał RosetteSep, a możliwość dalszego pasażowania tej populacji obserwowano tylko w jednym przypadku (Tabela 12).

Tabela 12. Porównanie liczby komórek MSC uzyskiwanych wyjściowo (po pierwszej trypsynizacji) z różnych źródeł (Uśrednione liczby ze wszystkich izolacji).

Liczba komórek MSC otrzymana z materiału wyjściowego	
WJ-MSC	100.000/15 skrawków (2 mm)
BM-MSC	20.000/ 1x10 ⁷ MNC
UCB-MSC	5.000/ 1x10 ⁷ MNC

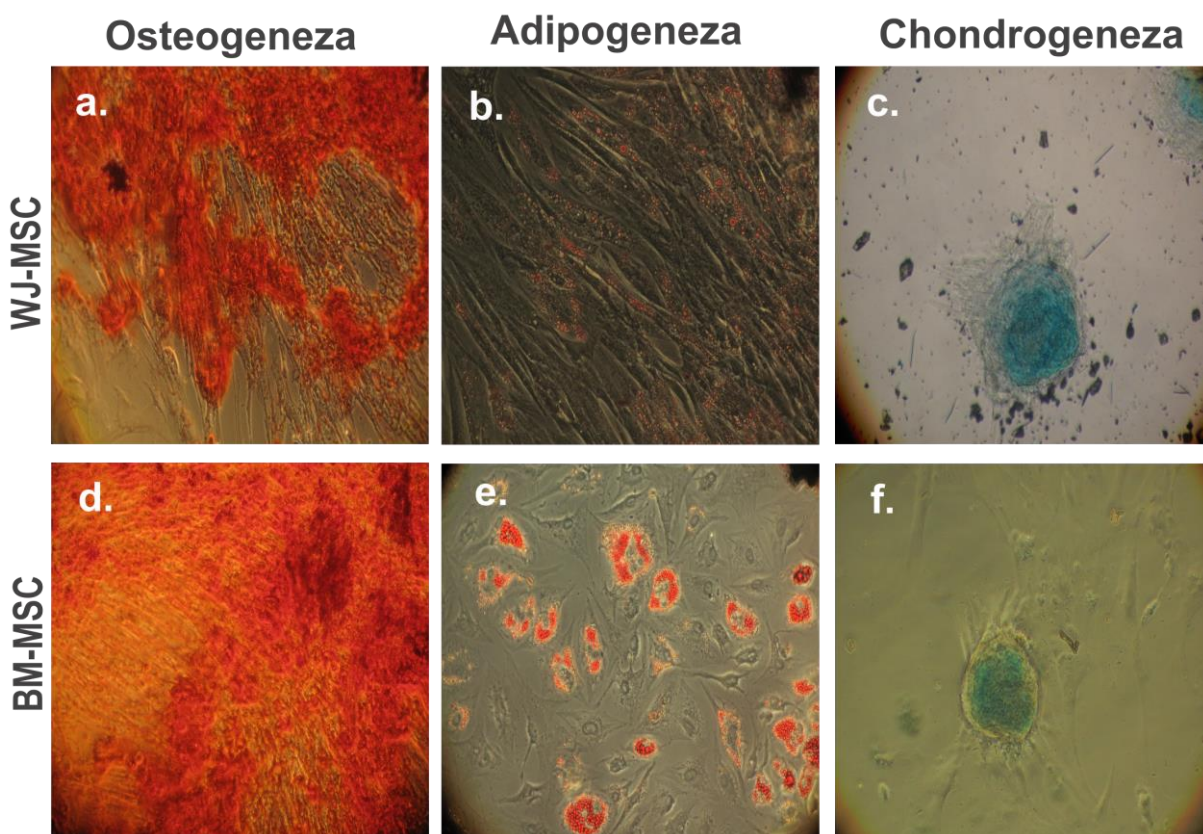
Ponadto, na podstawie uzyskanych wyników, należy podkreślić, że komórki z krwi pępowinowej okazały się bardzo ciekawą frakcją posiadającą największą wyjściową populację komórek pierwotnych o cechach pluripotencjalnych, co zostało potwierdzone ekspresją genów i białek markerowych. Jednak ze względu na obecność stosunkowo niewielkiego odsetka czystej populacji komórek mezenchymalnych wykluczono je z dalszych doświadczeń. Kolejne rozdziały pracy skupiają się na porównawczej analizie dwóch pozostałych rodzajów komórek mezenchymalnych wyizolowanych ze szpiku kostnego oraz galarety Whartona różniących się zasadniczo pozycją rozwojową tkanek źródłowych.

5.2. Mezodermalne różnicowanie MSC w adipocyty, chondrocyty i osteocyty

Jedną z kluczowych właściwości komórek mezenchymalnych jest ich zdolność do różnicowania się w podstawowe linie komórek pochodzenia mezodermalnego tworzące tkankę tłuszczową, chrzęstną i kostną. Potencjalne zdolności do różnicowania testowano na komórkach mezenchymalnych pochodzących ze szpiku kostnego oraz galarety Whartona na etapie 3 pasażu według protokołu opisanego w rozdziale 4.4. W obydwu rodzajach MSC otrzymano pozytywne wyniki potwierdzające prawidłowy charakter mezenchymalny tych komórek (ryc. 16). W czasie różnicowania w kierunku adipocytów obserwowana była zmiana kształtu z charakterystycznej dla komórek mezenchymalnych podłużnej (fibroblastycznej) morfologii, w komórki o kształcie bardziej okrągłym, zawierające kroplę odkładanego tłuszczu zabarwionego na czerwono w reakcji z czerwienią olejową. W komórkach ze szpiku zaobserwowano nieznacznie szybsze różnicowanie w kierunku adipocytów (ryc. 16).

Określając powodzenie procesu różnicowania w kierunku komórek tkanki chrzęstnej nie stwierdzono istotnych różnic między komórkami izolowanymi ze szpiku i galarety Whartona. W tym przypadku obserwowano powstawanie gwieździście rozchodzących się rozet komórek produkujących glikozaminoglikany wykrywane błękitem alcjanowym (ryc. 16).

Weryfikując różnicowanie komórek mezenchymalnych w osteocyty zauważono, że komórki z obu źródeł różnicowane według opisanego w rozdziale 4.4 protokołu wykazywały intensywną produkcję soli wapnia wykrywanych czerwienią alizarynową jednak o różnym rozkładzie i skupieniu (ryc. 16).



Ryc. 16. Wielokierunkowe różnicowanie komórek WJ-MSK i BM-MSK. Komórki różnicowane według protokołu opisanego w rozdziale 4.4 wybarwione na obecność kropli tłuszczu - czerwien olejowa (b, e), soli wapnia - czerwien alizarynowa (a, d) oraz błękitem alcjanowym-identyfikującym produkcję glikozaminoglikanów (c, f). Rycina przedstawia reprezentatywne zdjęcia z trzech niezależnych eksperymentów.

5.3. Analiza wzrostu i starzenia komórek MSC hodowanych w warunkach standardowych atmosferycznego stężenia tlenu (porównanie BM-MSK z WJ-MSK)

Uważa się, że dla celów terapeutycznych kluczowe jest uzyskanie dużej liczby komórek MSC znajdujących się w określonym stadium wzrostu, co w przypadku jednorazowego pobrania nie zawsze jest możliwe. Dlatego optymalizacja warunków hodowli *in vitro* pozwalająca na pozyskanie jak największej liczby szybko namnażających się komórek mezenchymalnych jest kluczowym elementem w opracowaniu wydajnych metod ich zastosowania terapeutycznego. W związku z powyższym przeprowadzono analizę dynamiki wzrostu hodowli badanych komórek uzyskanych z tkanek popłodowych i dorosłych (począwszy od momentu ich wyizolowania do pasaży 10 dla BM-MSK i 15 dla WJ-MSK) wraz z oceną szybkości podziałów oraz zmian morfologicznych związanych z procesem starzenia komórkowego. W trakcie prowadzenia hodowli *in vitro* analizowano różnice w obrębie badanych populacji MSC. Na wczesnych etapach (pierwszy i drugi pasaż) obydwie populacje WJ-MSK i BM-MSK nie wykazywały znaczących różnic w obrębie morfologii komórek.

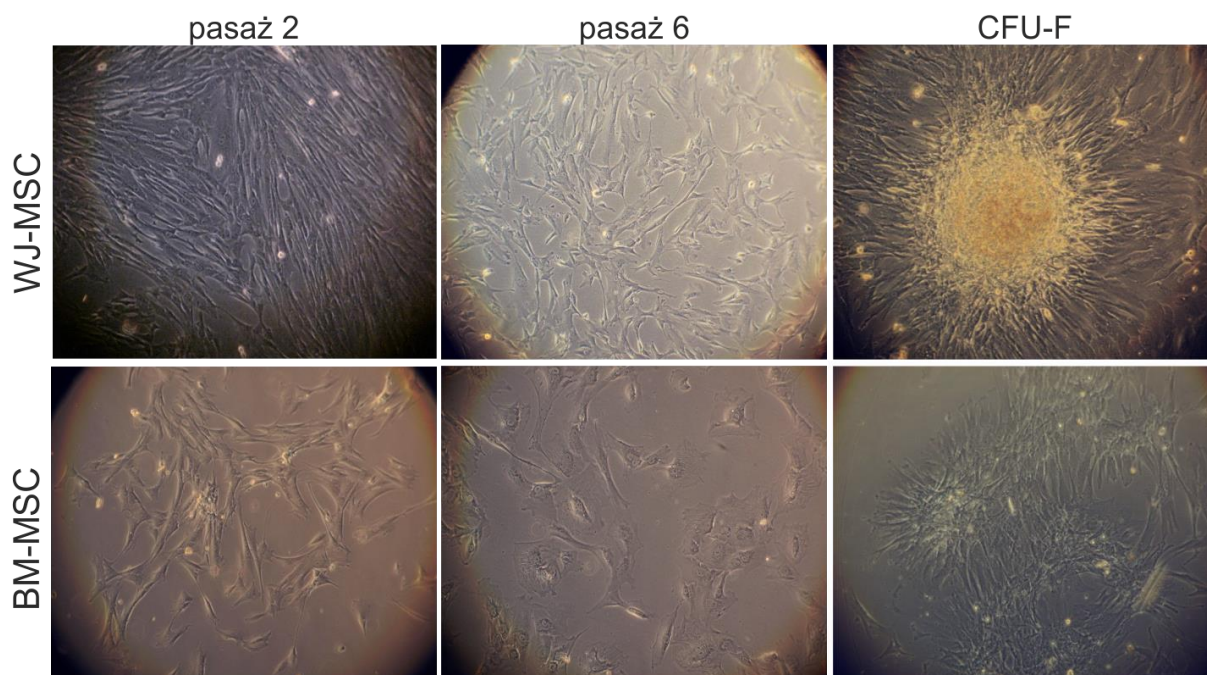
Następnie w trakcie kolejnych pasaży można było zaobserwować znaczące zmiany fenotypów komórek przede wszystkim związane z ich wielkością i kształtem. Analiza tych zmian wykazała prawie 400% wzrost rozmiarów komórek w badanych populacjach MSC. Komórki MSC ze szpiku kostnego już od etapu 6 pasażu zatracaly swój wrzecionowaty kształt i stawały się rozplaszczone i większe, ze zmianą pierwotnej średniej powierzchni z $1394 \mu\text{m}^2$ (n=4) do $5740 \mu\text{m}^2$ (n=4) (ryc. 17). W przeciwieństwie do komórek ze szpiku hodowla WJ-MSC wykazywała szybsze tempo i dłuższy czas logarytmicznego wzrostu a zmiany morfologii typowe dla starzenia hodowli pojawiały się dopiero około 10 pasażu. Komórki z galarety Whartona w stadium wczesnych pasaży (1-3) były podobnych rozmiarów do BM-MSC ($1320 \mu\text{m}^2$ n=6). W późniejszych pasażach (10-12) również zwiększały swoją powierzchnię do $5101 \mu\text{m}^2$ (n=6) jednak znacząco później niż BM-MSC. Na rycinie 17 przedstawione zostały reprezentatywne zdjęcia pokazujące zmiany fenotypów analizowanych komórek na podstawie obserwowanych różnic w morfologii. Dokładną analizę morfologii z uwzględnieniem zmian wielkości komórek oraz częstotliwość występowania CFU (ang. *Colony-Forming Units*) przedstawia tabela 13.

Ponadto w badaniach wykazano zależność pomiędzy zdolnością do tworzenia kolonii komórkowych CFU a pochodzeniem tkankowym komórek MSC. W przypadku WJ-MSC zaobserwowano znacząco większą ich liczbę, które w standardowo prowadzonej hodowli utrzymywały się do 7 pasażu. W hodowli komórek MSC ze szpiku nie obserwowano typowych CFU a jedynie pojedyncze agregaty/zgrupowania komórek przypominające struktury centrów rozrodczych, jednak ich wielkość jak i częstość występowania była znacznie niższa (ryc. 17, tabela 13). Obecność centrów intensywnej proliferacji CFU utrzymujących się w hodowli komórek w warunkach *in vitro* według niektórych badaczy uznawana jest za jedną z kluczowych cech macierzystości.

Tabela 13. Charakterystyka cech fenotypowych komórek MSC podczas długoterminowej hodowli *in vitro*, WJ-MSC (n=6), BM-MSC (n=4).

	WJ-MSC Wczesne 1-3 p	WJ-MSC Późne 10-12 p	BM-MSC Wczesne 1-3 p	BM-MSC Późne 6-8 p
Średnia powierzchnia komórek	1320 μm^2 ±105,1	5101 μm^2 ±324,19	1394 μm^2 ±104,2	5740 μm^2 ±304,73
% dużych komórek *	1-3%	80%	5-10%	85%
CFU/ 25 μm^2	2-5	1-3	1?	0

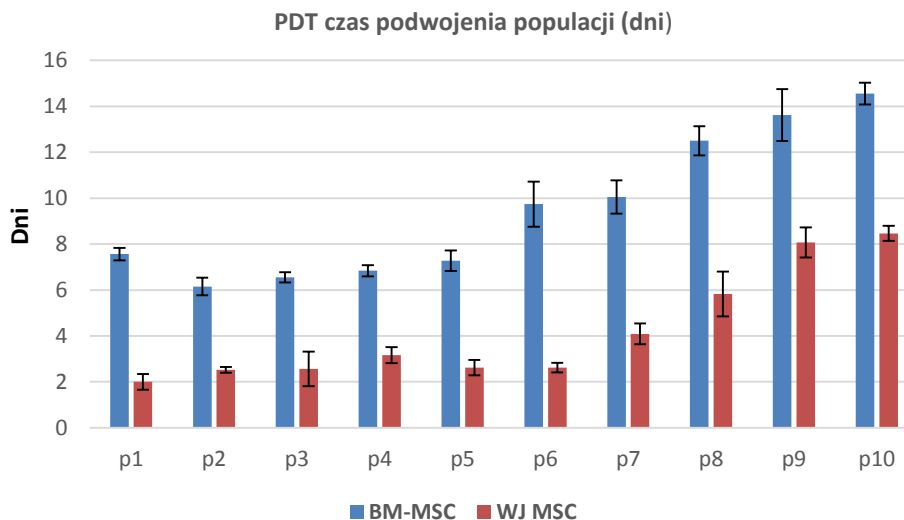
* duże komórki $>5000\mu\text{m}^2$



Ryc. 17. Zmiany morfologii komórek WJ-MSC i BM-MSC w trakcie trwania hodowli *in vitro*. W początkowej fazie hodowli obydwie populacje nie różnią się pod względem morfologii (pasaż 2). Zdjęcia uwidaczniają znaczącą różnicę w zagęszczeniu hodowli oraz częstości występowania centrów intensywnej proliferacji CFU (pasaż 6, CFU). Stwierdzono, że MSC w starszych hodowlach powyżej 10 pasażu w przypadku WJ-MSC oraz 6 pasażu dla BM-MSC tracą swój wrzecionowaty kształt, są dużo większe i bardziej płaskie w porównaniu z komórkami z początkowego stadium hodowli. Porównanie CFU w populacjach MSC wywodzących się ze szpiku i galarety Whartona. Obraz z mikroskopu świetlnego (powiększenie x100) pokazujący typowy ośrodek proliferacji WJ-MSC oraz analogiczną strukturę w BM-MSC.

Jedną z oznak starzenia się hodowli *in vitro* jest malejąca zdolność do podziałów komórek. W następnym eksperymencie zbadano więc kinetykę wzrostu długoterminowej hodowli MSC w standardowych warunkach od 1 do 10 pasażu. Na podstawie uzyskanej liczby komórek określano czas podwojenia ich populacji (PDT, ang. *Population Doubling Time*). Długoterminowa analiza wzrostu wykazała istotne różnice pomiędzy obydwoimi typami komórek MSC. Po pierwsze, przybliżony czas podwajania dla WJ-MSC był znacząco krótszy niż dla MSC izolowanych ze szpiku. Komórki WJ-MSC wykazywały zdolność do podziałów przez dłuższy czas hodowli, PDT utrzymywał się w zakresie średnio ~ 2,5 dnia do etapu 6 pasażu (ryc. 18). Po 9 pasażu PDT uległ istotnemu wydłużeniu w porównaniu z początkiem hodowli, osiągając stopniowo 8 dni. Doświadczenia na komórkach BM-MSC i WJ-MSC zakończono na tym samym etapie 10 pasażu ze względu na zbyt małe tempo wzrostu w komórkach ze szpiku kostnego (PDT powyżej 14 dni). Zauważono, że począwszy od wczesnych faz hodowli BM-MSC wykazywały dużo mniejszą dynamikę proliferacji, co miało odbicie w wydłużonym w porównaniu do komórek z galarety Whartona czasie podwajania populacji, który wynosił 7 dni. Czas PDT mierzony na końcowych pasażach (8-10) hodowli

również okazał się znacznie wyższy dla komórek ze szpiku, odpowiednio średnia wartość czasu podwojenia była o 75% (>12 dni) wyższa niż w grupie komórek izolowanych z galarety Whartona (tabela 14).



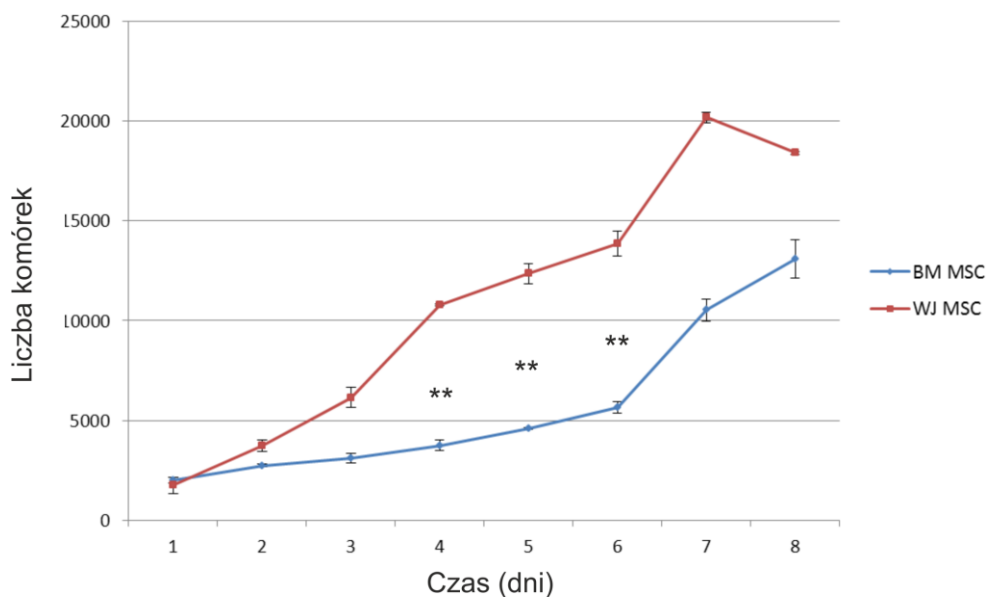
Ryc. 18. Długoterminowa analiza dynamiki wzrostu hodowli WJ-MSC ($n=3$) i BM-MSC ($n=3$). Porównanie czasu podwojenia populacji (PDT) na podstawie otrzymanej liczby komórek w hodowlach prowadzonych od 1 do 10 pasaży w warunkach standardowych. Słupki przedstawiają średnie (\pm SD) z trzech eksperymentów.

Tabela 14. Analiza kinetyki proliferacji hodowli komórek WJ-MSC i BM-MSC

	Średnie PDT 1-5 pasaż	Średnie PDT 6-10 pasaż	Teoretyczna liczba komórek uzyskana po 20 dniach hodowli *
WJ-MSC	2,53	5,81	19,5 mln
BM-MSC	6,87	12,09	1,2 mln

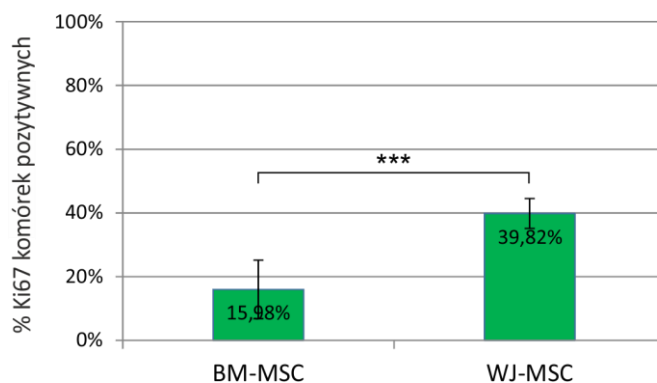
*uzyskana z 75.000 komórek inicjujących hodowlę *in vitro*

Kolejnym celem prezentowanej pracy było zbadanie tempa proliferacji komórek MSC w hodowli krótkoterminowej z zastosowaniem kolorymetrycznej metody z odczynnikiem WST-1 (Roche). Metoda ta opiera się na założeniu, że żywe metabolicznie czynne komórki są zdolne do redukcji bezbarwnych soli tetrazolu do intensywnie zabarwionych pochodnych formazanu. Rycina 19 przedstawia krzywe obrazujące tempo wzrostu komórek sporządzone na podstawie odczytu absorbancji. Stwierdzono, że komórki z galarety Whartona wykazywały zwiększoną dynamikę wzrostu. W trakcie analizy uzyskano prawie dwukrotnie lub trzykrotnie niższe wartości pomiarów dla MSC ze szpiku. Trzeciego dnia doświadczenia przyrost w grupie komórek ze szpiku wynosił $2,5 \times 10^3$, a w komórkach z galarety Whartona $5,5 \times 10^3$.



Ryc. 19. Krótkoterminowa analiza wzrostu komórek WJ-MSC ($n=3$) i BM-MSC ($n=3$). Wykres obrazuje liczbę komórek proporcjonalną do intensywności absorpcji wyznaczoną na podstawie krzywej standardowej z odczynnikiem WST-1. Punkty stanowią średnie (\pm SD) z trzech eksperymentów $**p<0,01$.

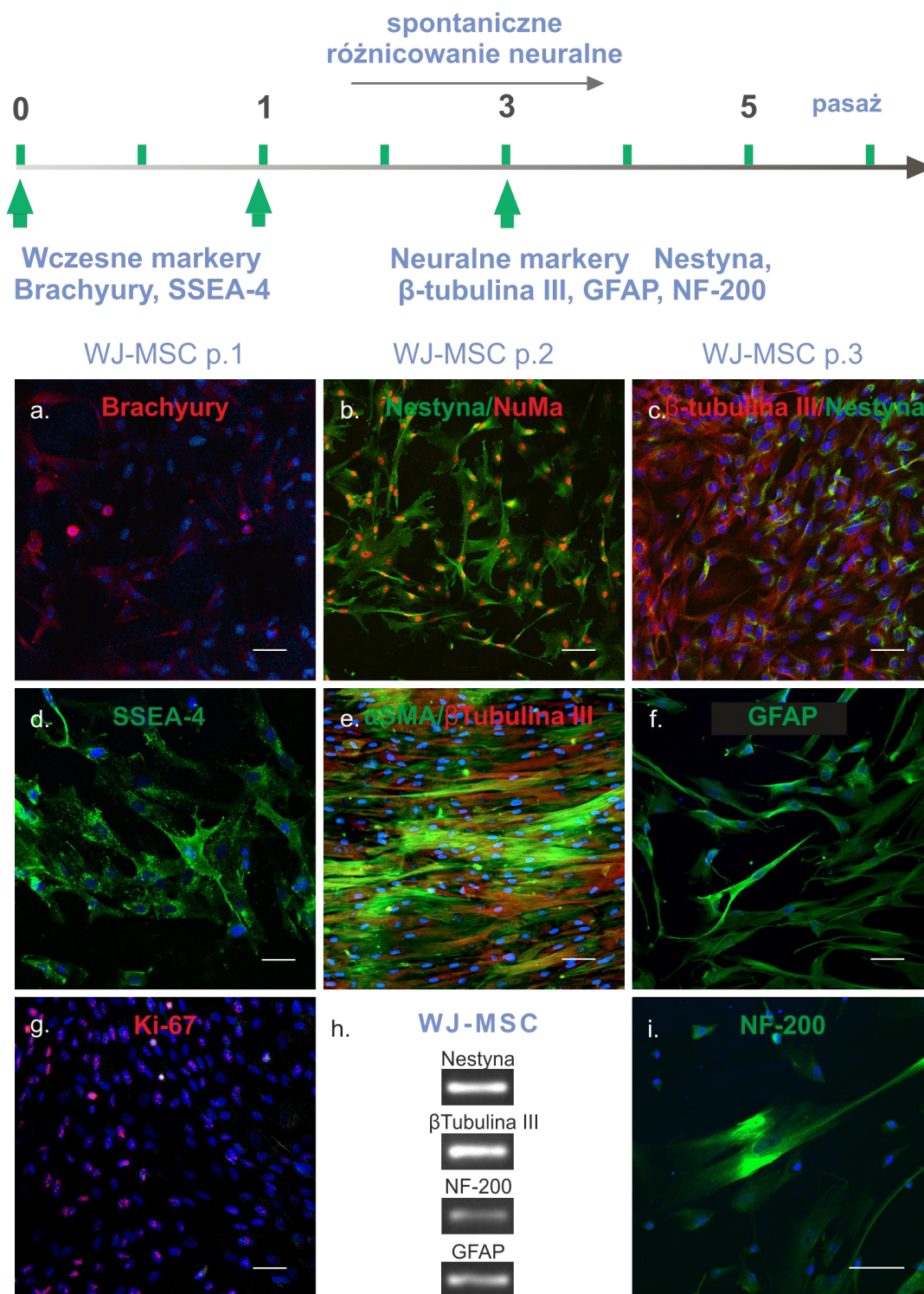
W kolejnym teście oceniano odsetek znajdujących się w cyklu podziałowym komórek, w przeprowadzonej analizie immunocytochemicznej na obecność jądrowego markera proliferacji Ki-67. Średnie ilości komórek Ki-67 pozytywnych różniły się istotnie w obu grupach wynosząc dla BM-MSC 15,98% komórek pozytywnych a 39,82% dla WJ-MSC ($p<0,001$) (ryc. 20). Podsumowując prowadzone badania z zastosowaniem testów proliferacji wykazano, że komórki pochodzące z galarety Whartona dzieliły się znacznie szybciej w porównaniu do komórek izolowanych ze szpiku kostnego.



Ryc. 20. Obecność antygeny proliferacji komórkowej Ki-67 wyrażona w średnich wartościach procentowych dla grupy komórek ze szpiku kostnego ($n=3$) i galarety Whartona ($n=3$). Każda wartość jest średnią (\pm SD) z trzech niezależnych eksperymentów $***p<0,001$.

5.4. Analiza spontanicznego różnicowania proneuralnego w populacji komórek MSC (WJ i BM) w standardowych warunkach hodowli *in vitro*

Ocena potencjału neurogennego komórek MSC polegała na określeniu ich zdolności do spontanicznego różnicowania w komórki o cechach neuralnych w czasie trwania hodowli *in vitro*. Analizowano zmiany ekspresji poszczególnych markerów neuralnych (neuronalnych, glejowych oraz markerów progenitorowych) w trakcie trzech kolejnych pasażów *in vitro*. Zmiany w ekspresji badanych markerów określano na poziomie mRNA i białka. Na rycinie 21 przedstawiono fenotypy komórek WJ-MSC z wczesnych etapów hodowli, które charakteryzowały się obecnością komórek pozytywnych pod względem markera SSEA-4, według danych literaturowych uznawanego za marker komórek niezróżnicowanych. Zaobserwowano również obecność stosunkowo dużej liczby komórek pozytywnych pod względem antygenu proliferacji Ki-67 oraz pojedyncze komórki pozytywne pod względem białka specyficznego dla mezodermy zarodkowej - brachyury. Uzyskane wyniki wykazały, że komórki pochodzące z galarety Whartona wykazują dużą plastyczność w trakcie hodowli *in vitro* i nabywają ekspresję markerów komórek neuralnych. Zaczynając od stosunkowo wczesnych etapów hodowli WJ-MSC (pasaż 2) komórki wykazują obecność białka nestyny - markera wczesnych progenitorów neuroektodermalnych. Dodatkowo obecność nestyny na poziomie ekspresji mRNA potwierdzono w MSC pochodzących z tego samego etapu (pasaż 2) (ryc. 21).

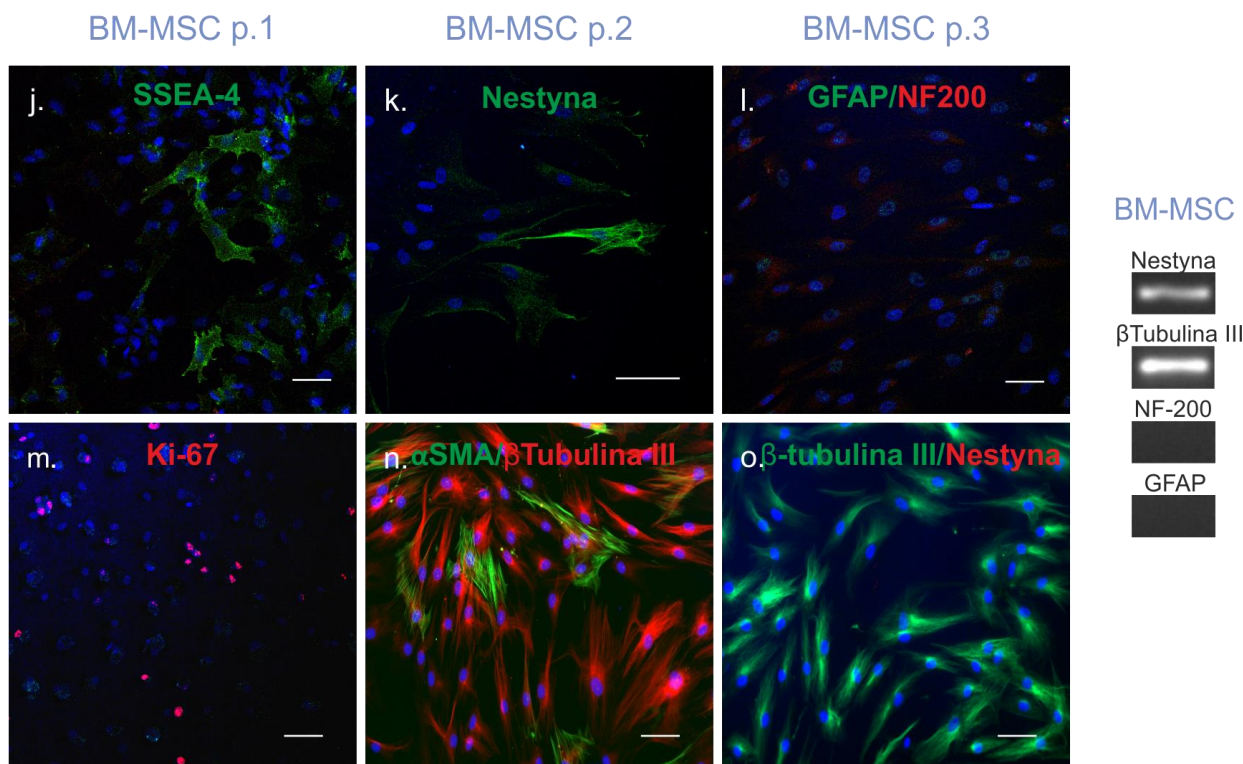


Ryc. 21. Spontaniczna indukcja ekspresji markerów neuralnych w komórkach WJ-MSC w trakcie trwania hodowli *in vitro*. Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego obrazujące barwienie immunocytochemiczne począwszy od wczesnego (p1) oraz późniejszego pasaży (p3). Obecność antygenu powierzchniowego SSEA-4 (d), Brachyury (a) i markera proliferacji Ki-67 (g) we wczesnym pasażu WJ-MSC. Komórki nabywają cech komórek neuralnych, spontanicznie zaczynają syntetyzować białko Nestynę - marker progenitorów neuroektodermalnych (b, c), α SMA (e) następnie pojawiają się pojedyncze komórki pozytywne pod względem GFAP (f), NF200 (i), oraz β -tubuliny III (c). Skala 50 μ m. Obrazy są reprezentatywne dla obserwacji wykonanych dla 6 niezależnych izolacji.

Na etapie 2 pasażu również zaobserwowano ekspresję kolejnego markera neuralnego β -tubuliny III. W trakcie trwania hodowli *in vitro* liczba komórek pozytywnych pod względem β -tubuliny III zwiększała się wypierając stopniowo komórki nestyno-pozytywne. Zwiększenie produkcji białka β -tubuliny III mogłoby wskazywać na ukierunkowanie komórek do dalszego różnicowania neuralnego. Dzięki zastosowaniu podwójnego znakowania w obrazie mikroskopowym uwidocznione zostały oprócz komórek β -tubulino III-pozytywnych również komórki dodatnie pod względem aktyny α SMA (ang. *Alpha-Smooth Muscle Actin*). Na kolejnym etapie hodowli (pasaż 3) wyniki wykonanych reakcji immunocytochemicznych wykazały obecność antygeny neurofilamentu ciężkiego NF200 (ryc. 21), charakterystycznego dla cytoszkieletu wczesnych neuronów. Wśród populacji komórek WJ-MSC z tego samego stadium hodowli zaobserwowano również komórki prezentujące obecność kwaśnego białka włóknikowego GFAP. Ekspresja tego białka może być związana zarówno z progenitorami neuralnymi jak i z astrocytami. Uzupełnieniem powyżej opisanych badań stanowiło badanie poziomu ekspresji genów dla tych samych białek. Trend w ekspresji tych genów odwzorowywał wyniki uzyskane w badaniach ICC, potwierdzając ekspresję GFAP, β -tubuliny III oraz NF200.

Zgodnie z przedstawionym obrazem immunocytochemicznym komórki populacji wyizolowanej ze szpiku różniły się intensywnością znakowania z przeciwciałem SSEA-4, zaobserwowano słabszą reakcją z tym przeciwciałem w porównaniu do komórek WJ-MSC. W komórkach ze szpiku nie zaobserwowano również markerów wczesnej mezodermy. Komórki te były negatywne w reakcji immunocytochemicznej z przeciwciałem skierowanym przeciwko brachyury (ryc. 22).

Jak przedstawiono na rycinie 22 identyfikacja ekspresji markerów neuralnych na poziomie mRNA i białka różniła się zasadniczo w hodowlach MSC ze szpiku kostnego. Pierwszą różnicą w porównaniu do WJ-MSC jaką zaobserwowano we wczesnych pasażach komórek BM-MSC był znacząco niższy poziom ekspresji nestyny zarówno na poziomie białka jak i mRNA. W przypadku BM-MSC analiza immunocytochemiczna wykazała obecność jedynie pojedynczych komórek pozytywnych pod względem tego białka. Co ciekawe, w porównaniu do WJ-MSC komórki ze szpiku nie nabywały spontanicznej ekspresji badanych markerów neuralnych. Nie zaobserwowano indukcji ekspresji neurofilamentu NF-200 oraz GFAP, potwierdzoną również brakiem transkrypcji odpowiednich genów. Dość intrygującym i niewątpliwie kontrowersyjnym wynikiem była obecność mRNA dla genu β -tubulina III wraz z obecnością odpowiadającego mu białka. W przypadku ekspresji mRNA genu β -tubuliny III nie odnotowano różnic pomiędzy analizowanymi komórkami pochodzącymi z obu źródeł.

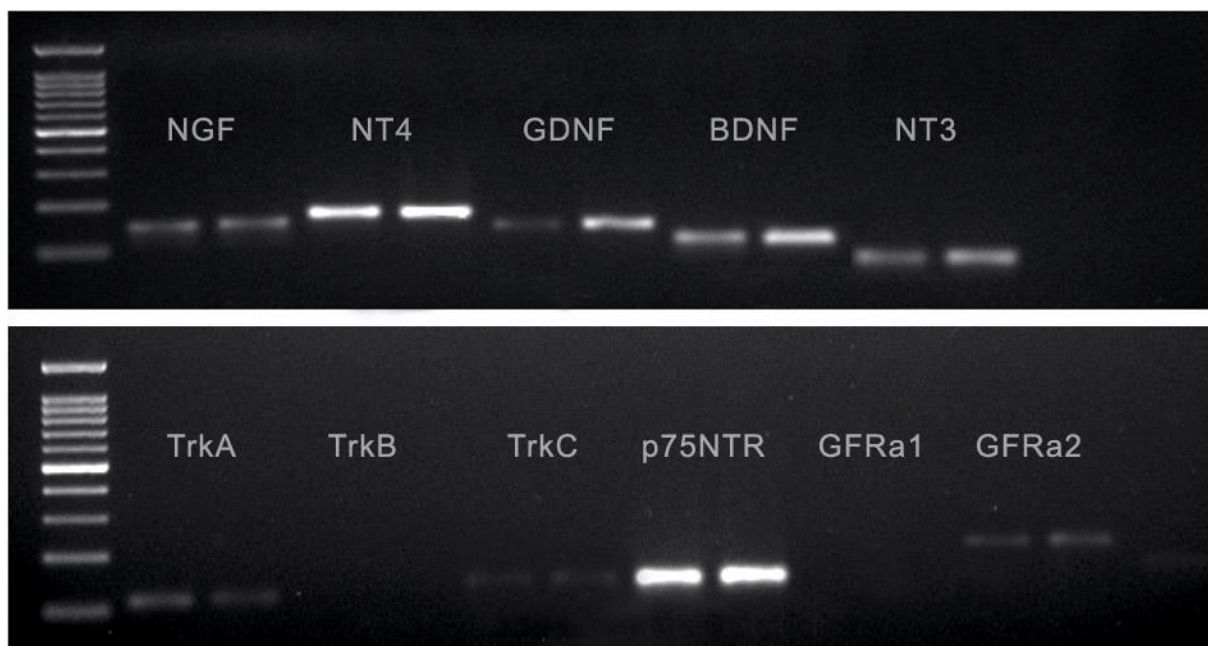


Ryc. 22. Określenie spontanicznego fenotypu neuralnego w równolegle prowadzonych hodowlach komórek mezenchymalnych pochodzących ze szpiku kostnego. Zdjęcia z mikroskopu konfokalnego obrazujące barwienie immunocytochemiczne począwszy od wczesnego (p1) oraz późniejszego pasażu (p3). Obecność antygenu powierzchniowego SSEA-4 (j) i markera proliferacji Ki-67 (m) we wczesnym pasażu BM-MSC. Tylko pojedyncze komórki nabywały cech neuralnych, w reakcji immunocytochemicznej nieliczne pozytywne i zanikające w kolejnych pasażach pod względem obecności białka nestyny (k/o), brak obecności komórek pozytywnych NF200 i GFAP (l) ale pozytywne pod względem ekspresji β Tubuliny III pojawiającej się na etapie pasażu 2 i utrzymującej się w kolejnych etapach hodowli (n,o). Skala 50 μ m. Obrazy są reprezentatywne dla obserwacji wykonanych dla 4 niezależnych izolacji.

5.5. Aktywność transkrypcyjna komórek MSC dla genów wybranych czynników neurotroficznych i specyficznych dla nich receptorów w standardowych warunkach hodowli *in vitro*

W dalszych badaniach skupiono się na ocenie właściwości parakrynych komórek MSC, które według aktualnych danych literaturowych mogą mieć korzystny wpływ na endogenne procesy regeneracyjne organizmu. W eksperymentach określono potencjał MSC pochodzących ze szpiku oraz galarety Whartona do produkcji czynników neurotroficznych oraz ekspresji specyficznych dla nich receptorów na poziomie mRNA. Analizę jakościową ekspresji mRNA dla wybranych czynników i receptorów przeprowadzono na komórkach będących na tym samym etapie hodowli (pasaż 3/4) utrzymywanych w standardowych warunkach hodowli *in vitro* (21% O₂). W badaniach stwierdzono wysoki poziom ekspresji genów kodujących: NGF,

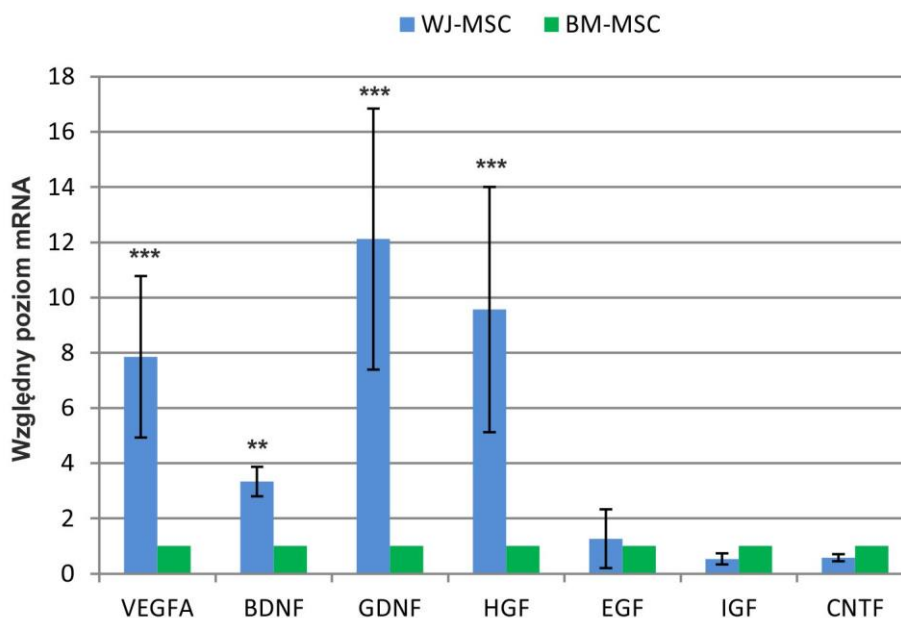
NT3, NT4, BDNF oraz czynnik wzrostu pochodzenia glejowego (GDNF, ang. *Glial Cell line-Derived Neurotrophic Factor*). Dość ciekawą obserwacją potwierdzającą parakrynową funkcję komórek MSC był niski poziom lub brak ekspresji receptorów dla tych czynników. Komórki MSC nie wykazywały ekspresji: TrkA, TrkB, TrkC, GFR α -1 (ang. *Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Receptor 1*). W analizowanych populacjach stwierdzono natomiast ekspresję receptora p75^{NTR} oraz nieznaczny poziom transkryptu GFR α 2 (ang. *Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Receptor 2*) (ryc. 23).



Ryc. 23. Produkty reakcji RT-PCR dla czynników neurotroficznych (NGF, NT4, GDNF, BDNF, NT3) oraz receptorów (Trk-A, Trk-B, Trk-C, p75^{NTR}, GFR α -1, GFR α -2) w komórkach BM-MSK i WJ-MSK pochodzących z pasaży trzeciego hodowli standardowej.

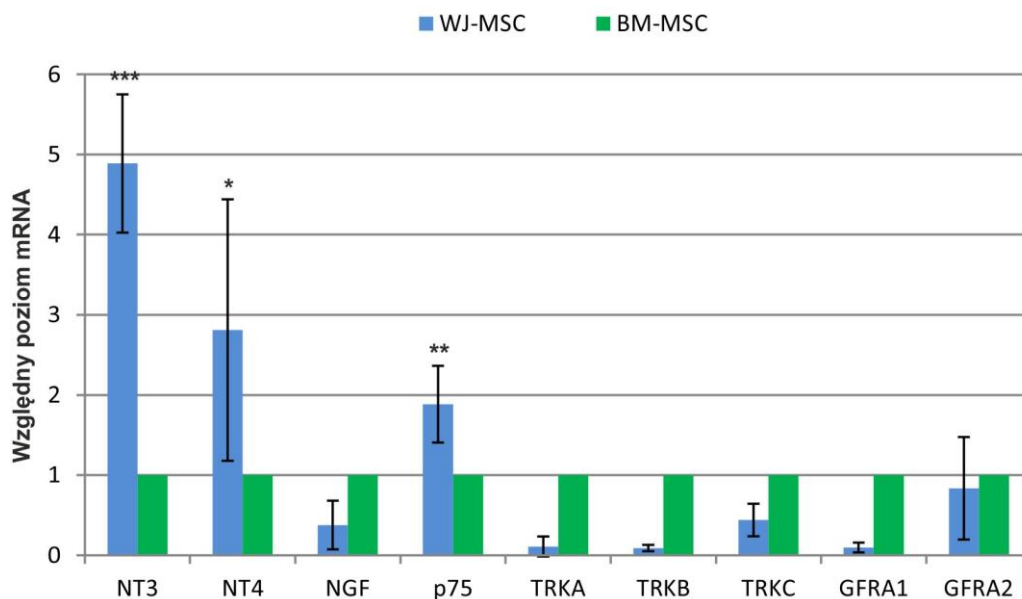
W kolejnych doświadczeniach w celu wyodrębnienia różnic ilościowych pomiędzy populacjami WJ-MSK i BM-MSK przeprowadzono badania wybranych neurotrofin i receptorów metodą ilościowej oceny ekspresji genów w czasie rzeczywistym (qRT-PCR). Otrzymane wyniki ujawniły zróżnicowany poziom ekspresji mRNA dla czynników troficznych w obydwu populacjach komórek MSC. Zaobserwowano statystycznie istotnie wyższy poziom ekspresji genów dla VEGF ($p < 0,001$), GDNF ($p < 0,001$), HGF (ang. *Hepatocyte Growth Factor*) ($p < 0,001$) oraz BDNF ($p < 0,01$) w komórkach MSC z galarety Whartona. Ilościowa ekspresja transkryptu genu dla czynnika troficznego VEGF wykazała prawie ośmiokrotnie wyższą wartość uzyskaną w grupie komórek WJ-MSK. Tendencja w ekspresji pozostałych neurotrofin była podobna w obu grupach. Odnotowano prawie czterokrotny wzrost ilości mRNA dla BDNF oraz najwyższy dwunastokrotny wzrost dla genu czynnika GDNF. Nie zaobserwowano

znaczących różnic w poziomie intensywności ekspresji mRNA dla pozostałych genów IGF (ang. *Insulin Growth Factor*), EGF oraz CNTF (ang. *Ciliary Neurotrophic Factor*).



Ryc. 24. Analiza ekspresji mRNA czynników neurotroficznych w komórkach WJ-MSC i BM-MSC pochodzących z hodowli *in vitro* na etapie trzeciego pasażu. Wykresy przedstawiają wyniki porównania ekspresji genów uzyskane metodą $\Delta\Delta C_t$ (Real-Time qRT-PCR) wyrażone w jednostkach względnych w stosunku do komórek BM-MSC. Każda z prób była normalizowana w stosunku do genu referencyjnego GAPDH. Wyniki badań przedstawione, jako wartości średnie $n=3$ (\pm SD) wynik analizy statystycznej uzyskano stosując test Bonferroni; * $p<0.05$; ** $p<0.01$; * $p<0.001$.**

Kolejną grupę stanowiła ekspresja genów czynników kodujących NT3, NT4, NGF, oraz receptorów p75^{NTR}, TRKA, TRKB, TRKC, GFR1 α , GFR α 2 (ryc. 25). Ilościowa ekspresja transkryptów genów dla NT3 i NT4 wykazała odpowiednio pięciokrotny ($p<0,001$) i trzykrotny ($p<0,05$) wzrost wartości w komórkach WJ-MSC w porównaniu do komórek BM-MSC. Analizując poziomy transkryptów receptorów dla neurotrofin, zaobserwowano istotny statystycznie, wyższy poziom ekspresji dla p75^{NTR} ($p<0,01$) w komórkach WJ-MSC oraz stabilny w obydwu frakcjach poziom ekspresji dla receptora GFR α 2. Geny pozostałych receptorów, podobnie jak czynnika NGF, wykazywały jedynie śladowy poziom ekspresji, którą uzyskano przy liczbie cykli Ct powyżej 32. W przeliczeniu do genu referencyjnego dawało to wynik interpretowany jako śladowy poziom ekspresji na granicy tła w obu grupach badanych komórek MSC.



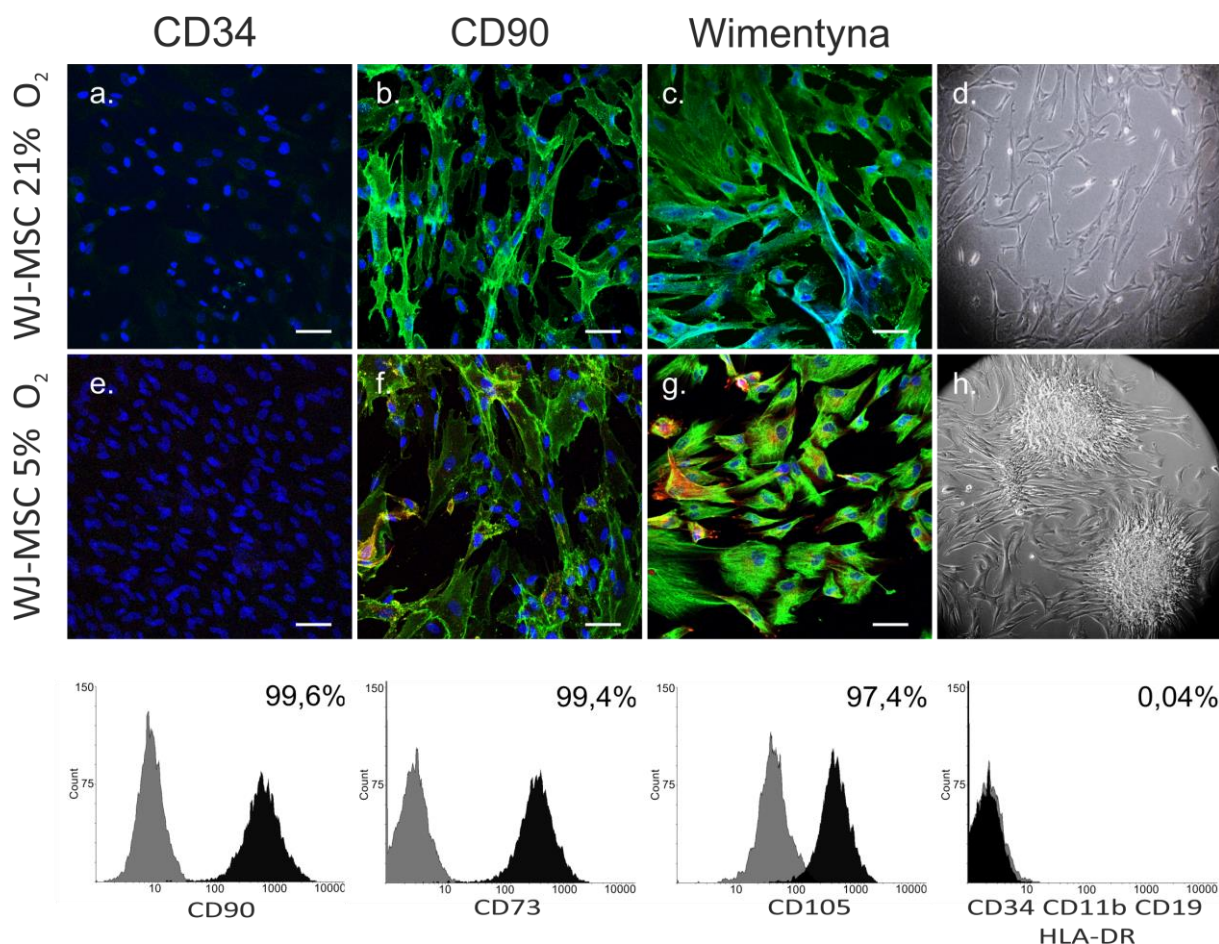
Ryc. 25. Analiza ekspresji mRNA czynników neurotroficznych i receptorów w komórkach WJ-MSC i BM-MSC pochodzących z trzeciego pasażu hodowli *in vitro*. Wykresy przedstawiają wyniki porównania ekspresji genów uzyskane metodą $\Delta\Delta Ct$ (Real-Time qRT-PCR) w jednostkach względnych przeliczone w stosunku do kalibratora próby BM-MSC. Każda z prób była normalizowana w stosunku do genu referencyjnego tubulinyB1 (TUB1). Wykresy prezentują wartości średnie $n=3$ (\pm SD). Wynik analizy statystycznej uzyskano stosując test Bonferroni; * $p<0,05$, ** $p<0,01$, * $p<0,001$.**

5.6. Wpływ obniżonego do 5% stężenia tlenu w środowisku na hodowlę komórek mezenchymalnych

W następujących badaniach zmieniono warunki hodowli *in vitro* komórek MSC poprzez obniżenie stężenia parcjalnego tlenu z 21% do poziomu 5%. Według danych literaturowych obniżone w stosunku do atmosferycznego stężenie tlenu odpowiada warunkom panującym fizjologicznie w niszy komórek macierzystych, co w istotny sposób może wpływać na wydajność prowadzonej hodowli. W przeprowadzonych doświadczeniach komórki mezenchymalne wyizolowane z galarety Whartona oraz szpiku kostnego hodowane były w standardowej atmosferze (21% O₂) do etapu 2 pasażu a następnie przenoszone do atmosfery obniżonego 5% O₂. W komórkach MSC hodowanych w powyższych warunkach oceniano morfologię, tempo proliferacji oraz stopień zróżnicowania poprzez określanie ekspresji markerów charakterystycznych zarówno dla komórek pluripotencjalnych jak i markerów związanych z różnicowaniem pro-neuralnym. W ustalonych punktach czasowych (2 tygodnie, 1 miesiąc, 2 miesiące) pobierano materiał i analizowano go pod kątem ekspresji mRNA i obecności białek.

5.6.1. Wpływ hodowli w atmosferze obniżonego do 5% stężeniu tlenu na fenotyp komórek WJ-MSC_{NT}

Analizując wpływ warunków obniżonego tlenu na morfologię komórek pochodzących z galarety Whartona wykazano, że WJ-MSC_{NT} były mniejsze i dużo gęściej zarastały powierzchnię naczynia hodowlanego w porównaniu do WJ-MSC. Ponadto zaobserwowano pojawianie się zwiększonej liczby CFU. Komórki hodowane standardowo w atmosferze 21% O₂ już po 4-5 pasażach stawały się większe i płatowne, jak to opisano w odpowiednim rozdziale poprzedzającym. Pomimo zaobserwowanych zmian w morfologii, charakterystyka typowych markerów mezenchymalnych w komórkach hodowli w obniżonych warunkach tlenowych nie wykazała zasadniczych zmian. Pozytywny fenotyp mezenchymalny potwierdziła obecność antygenów CD90 i wimentyny oraz brak markera linii hematopoetycznej CD34. Wyniki cytometrii przepływowej potwierdziły również mezenchymalny charakter hodowli. Po 2 miesiącach hodowli ponad 90% komórek było pozytywnych pod względem specyficznych markerów CD90⁺, CD73⁺, CD105⁺ oraz negatywnych dla CD34⁻, CD11b⁻, CD19⁻, CD45⁻, HLA-DR⁻.

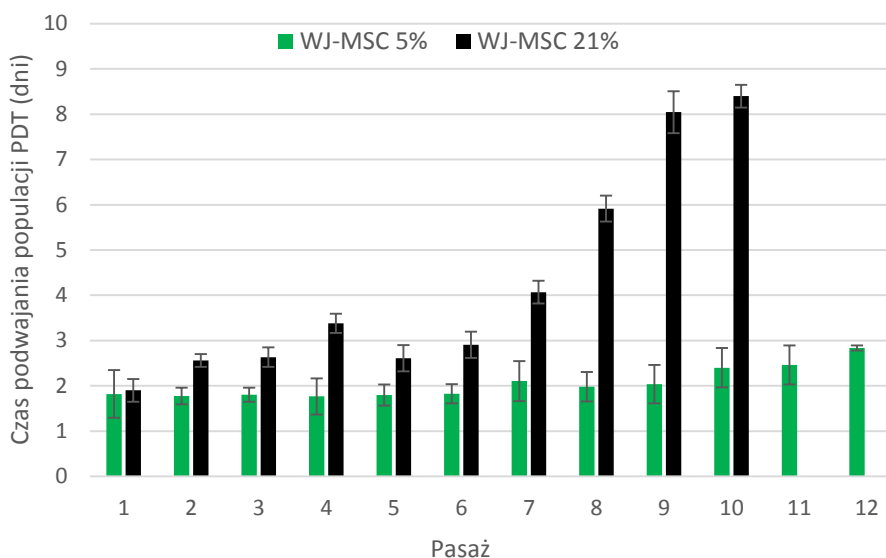


Ryc. 26. Różnice morfologiczne pomiędzy WJ-MSC hodowanymi w warunkach obniżonego 5% tlenu (h) w stosunku do 21% stężenia tlenu (d). Znakowanie jąder barwnikiem Hoechst uwidacznia zróżnicowanie w gęstości prowadzonych hodowli, dużo liczniej rosnącymi w obniżonym tlenu (a,e). Zdjęcia z mikroskopu świetlnego-obecność większej liczby centrów intensywnej proliferacji w komórkach hodowanych w obniżonym stężeniu tlenu. Brak różnic w ekspresji typowych markerów mezenchymalnych CD90 (b,f) oraz wimentyny (c,g) pomiędzy komórkami hodowanymi w obu stężeniach tlenu. Barwienie uwidacznia jedynie różnice w wielkości komórek w dwóch hodowliach. Skala 50 μm . Poniżej: Analiza cytometryczna populacji komórek WJ-MSC_{NT}. Reprezentatywne histogramy potwierdzające prawidłowy fenotyp mezenchymalny scharakteryzowany na podstawie obecności antygenów CD90, CD73, CD105 oraz brakiem CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR.

5.6.2. Wpływ obniżonego stężenia tlenu na tempo proliferacji komórek WJ MSC_{NT}

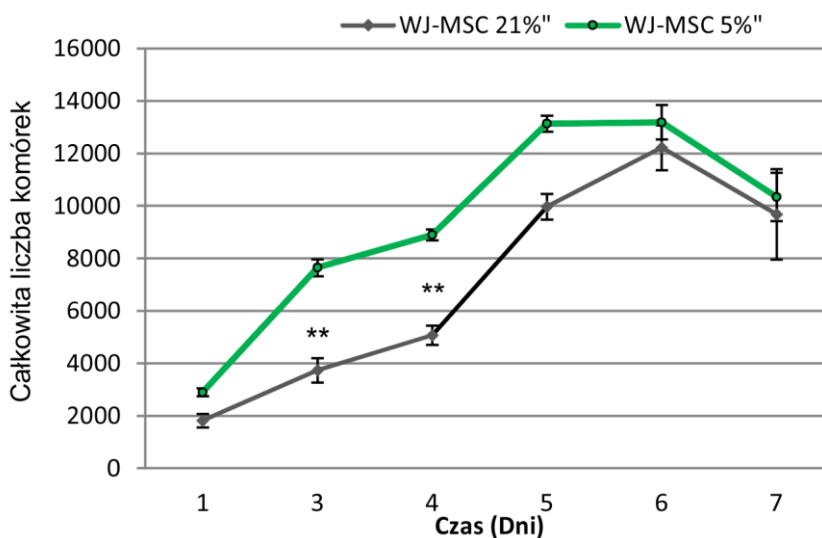
Wpływ obniżenia stężenia tlenu na wydajność proliferacji komórek analizowano równolegle do standardowej hodowli w warunkach 21% O₂. We wszystkich analizowanych doświadczeniach (długoterminowych i krótkoterminowych) zaobserwowano korzystny wpływ 5% tlenu na tempo proliferacji. Konfluencję wynoszącą 70-80% komórki osiągały już po 2-3 dniach hodowli, podczas gdy MSC w warunkach atmosferycznych wymagały około 7 dni do uzyskania tej samej konfluencji. Dokładna analiza standardowej hodowli w 21% tlenu została

opisana we wcześniejszych rozdziałach pracy. Jednak w tych warunkach komórki wykazywały ograniczoną zdolność do podziałów, po 8 pasażach potencjał proliferacyjny komórek malał, co miało odzwierciedlenie w wydłużonym PDT wynoszącym 6 dni. W komórkach równolegle hodowanych w 5% tlenie tempo podziałów utrzymywało się na stałym poziomie przez dłuższy czas hodowli, nawet do etapu 12 pasażu, a czas podwajania populacji wynosił średnio 2 dni (ryc. 27).



Ryc. 27. Wpływ warunków obniżonego tlenu do 5 % O₂ na proliferację komórek WJ-MSC. Długoterminowa analiza proliferacji w równolegle prowadzonych hodowli na podstawie uzyskanej liczby czasu podwojenia populacji (PDT) od 1 do 11 pasażu. Punkty stanowią średnie \pm SD z trzech eksperymentów.

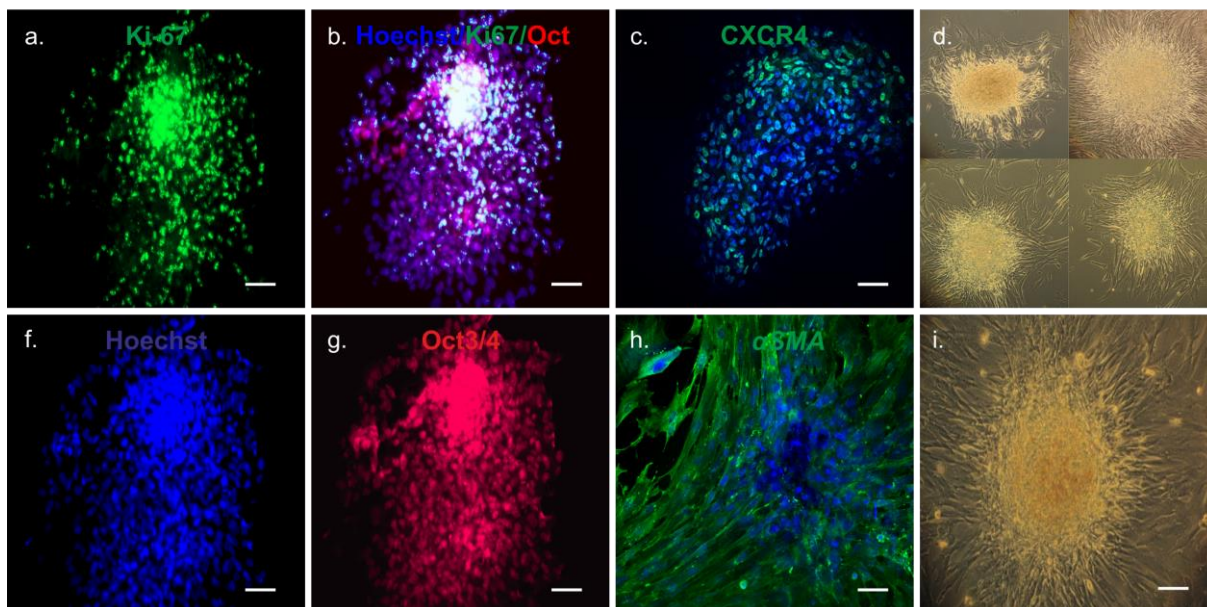
Kolejnym etapem badań była krótkoterminowa analiza proliferacji oparta na metodzie pomiaru aktywności metabolicznej komórek za pomocą komercyjnego odczynnika WST-1. Wykazano, że komórki WJ-MSC_{NT} w okresie liniowego wzrostu począwszy od trzeciego dnia eksperymentu dzieliły się prawie dwukrotnie szybciej w porównaniu z równolegle prowadzoną hodowlą WJ-MSC (ryc. 28). N.p. w trzecim dniu pomiaru odnotowano statystycznie istotny przyrost w grupie WJ-MSC_{NT}, który wynosił 7640 (\pm 234) w stosunku komórek WJ-MSC 3728 (\pm 487).



Ryc. 28. Wpływ warunków obniżonego tlenu (5 % O₂) na proliferację komórek WJ-MSC. Tygodniowa analiza proliferacji metodą z zastosowaniem odczynnika WST-1 oceniającej aktywność metaboliczną komórek. Punkty stanowią średnie ± SD z trzech eksperymentów. ** $p < 0.01$

Hodowle WJ-MSC_{NT} znacznie dłużej zachowywały zdolność do intensywnych podziałów w porównaniu do WJ-MSC, o czym świadczyła również większa liczba widocznych ośrodków rozmnażania-centrów intensywnej proliferacji. Barwienia ICC wykazały pozytywną reakcję z markerem proliferacji Ki-67 w centrum ośrodka (prawie 100% komórek pozytywnych) oraz z tendencją do zmniejszania liczby komórek pozytywnych na zewnętrznych obszarach tej struktury, osiągając w rejonie „monowarstwy”, 63,14% (±12,86) komórek Ki67 pozytywnych (ryc. 29). Obszary intensywnej proliferacji były immunopozytywne również pod względem obecności pluripotencyjnych czynników transkrypcyjnych. W centrum struktury CFU sygnał fluorescencji dla Oct4A był zlokalizowany w jądrach komórkowych, natomiast komórki poza tym obszarem nie wykazywały takiej lokalizacji. W tych komórkach sygnał fluorescencji widoczny był głównie w cytoplazmie oraz na zewnątrz komórki. Podobnie jądrową lokalizację w ośrodkach CFU zaobserwowano dla białka CXCR-4 (ang. *CXC chemokine receptor type-4*). Według niektórych danych taka lokalizacja może być kojarzona ze zwiększonym potencjałem migracyjnym niezróżnicowanych komórek.

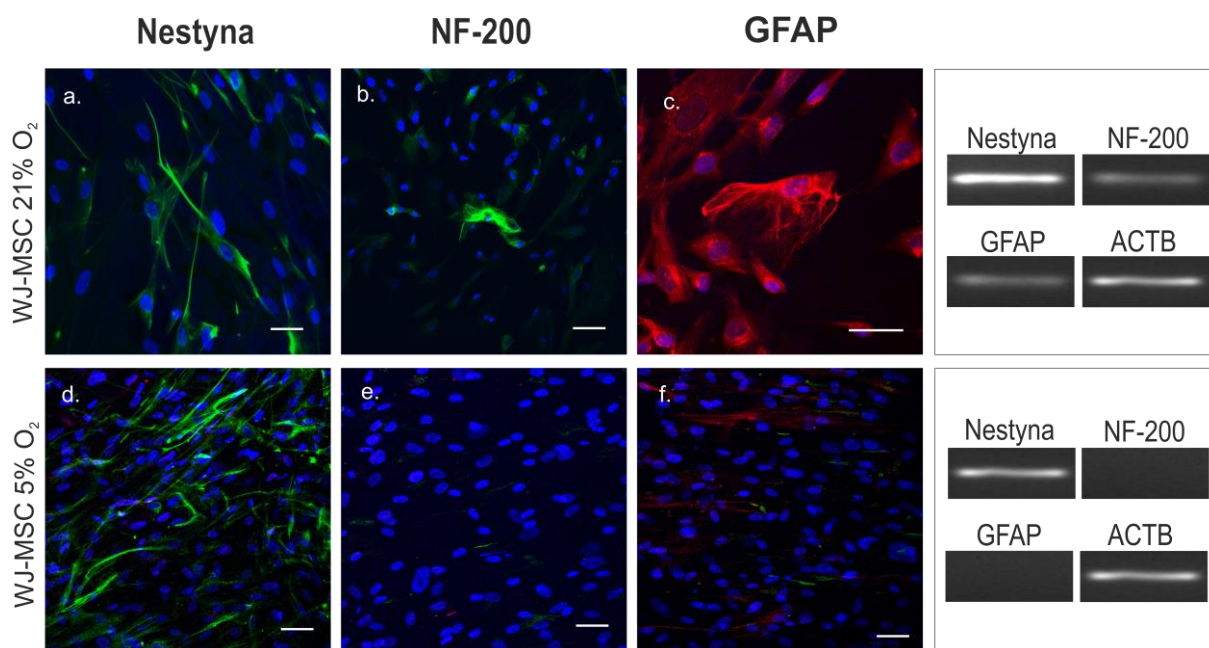
Immunocytochemiczna charakterystyka CFU powstających w hodowli w WJ-MS



Ryc. 29. Charakterystyka struktury ośrodka rozmnażania - CFU w WJ-MS_{NT} w hodowli w warunkach 5% stężeniu tlenu. Komórki hodowane w obniżonym stężeniu tlenu wykazują tendencję do zwiększania charakterystycznych struktur dla komórek macierzystych, tzw. centrów intensywnej proliferacji (d,i), składających się z gęsto upakowanych komórek jedna na drugiej (f) wyróżniających się wysoką ekspresją Ki-67 (a,b - kolor zielony), czynnika transkrypcyjnego Oct3/4 (b,g - kolor czerwony) oraz CXCR4 (c - kolor zielony) i α SMA (h - kolor zielony). Jądra komórkowe wybarwione odczynikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 50 μ m.

5.6.3. Brak spontanicznego różnicowania neuralnego w WJ-MS_{NT}

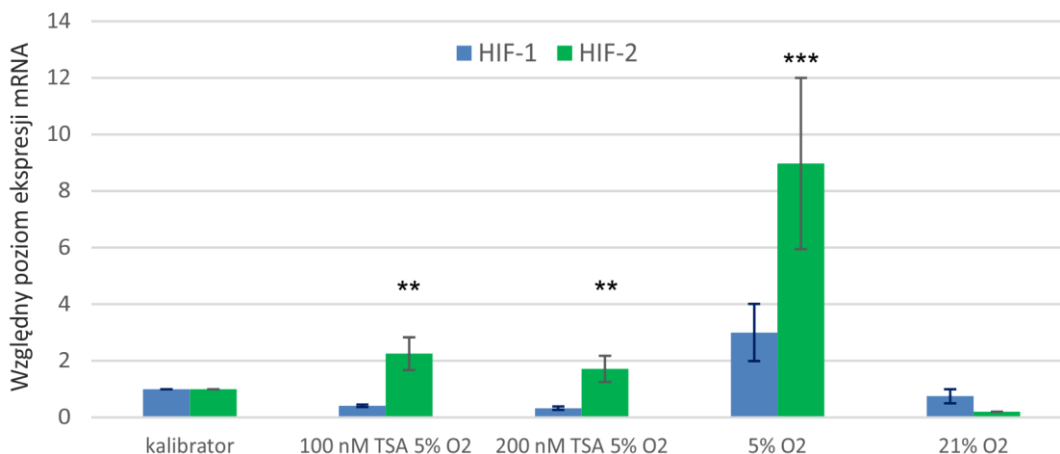
Kolejne doświadczenia dotyczyły sprawdzenia wpływu zastosowanych warunków obniżonego tlenu na ekspresję genów różnicowania neuralnego. Okazało się, że w warunkach obniżonego tlenu geny typowe zarówno dla różnicowania astrocytarnego (GFAP) jak i neuralnego (NF200) obecne w hodowlach w warunkach standardowych podlegają wyciszeniu i/lub nie są aktywowane. Dłuższa hodowla komórek WJ-MS_{NT} (2 miesiące) powodowała całkowity zanik markerów różnicowania neuralnego (NF200, GFAP) na poziomie zarówno mRNA jak i białka obserwowanego wcześniej w hodowli standardowej (ryc. 30). Wyniki te wskazują, że hodowla komórek WJ-MS_{NT} w warunkach obniżonego stężenia tlenu (5%) prowadzi do odróżnicowania ich fenotypu do poziomu komórek mniej zróżnicowanych.



Ryc. 30. Analiza immunocytochemiczna markerów neuralnych w komórkach WJ-MSC po 2 miesięcznej hodowli w niskim tlenu. Obecność NF200 (b) oraz GFAP (c) w standardowo prowadzonej hodowli oraz zanik tych markerów w warunkach obniżonego tlenu (e, f). Zwiększenie białka nestyny (d). Jądra komórkowe wybarwione odczynnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 50 μm . Analiza mRNA z wykorzystaniem metody RT-PCR potwierdziła zanik ekspresji NF200 oraz GFAP na poziomie mRNA.

5.6.4. Indukcja ekspresji genów HIF w komórkach WJ-MSC_{NT}

W kolejnym etapie pracy poddano analizie ekspresję genów kodujących czynniki indukowane hipoksją HIF- α . Podczas hodowli w obniżonym stężeniu tlenu zaobserwowano indukcję genów związanych z hipoksją HIF-1 α oraz HIF-2 α . Otrzymane wyniki przedstawia rycina 31. Analiza mRNA z wykorzystaniem metody PCR w czasie rzeczywistym z zastosowaniem sond hybrydacyjnych TagMan ujawniła, że HIF-1 α i HIF-2 α ulegają ekspresji zarówno w komórkach hodowanych w atmosferycznym jak i w obniżonym stężeniu tlenu. Jednak poziom transkryptów genów HIF-1 α i HIF-2 α analizowany PCR w czasie rzeczywistym różnił się istotnie w zależności od warunków tlenowych. Wykazano, że ekspresja HIF-2 α wzrasta nawet 9 krotnie podczas inkubacji w 5% stężeniu tlenu, osiągając maksymalny poziom po 1 miesiącu od momentu indukcji hipoksji (ryc. 31). W przypadku ekspresji mRNA dla genu HIF-1 α zaobserwowano podobną tendencję, jednak odnotowany wzrost był jedynie 3 krotnie wyższy w porównaniu do komórek ze standardowej hodowli WJ-MSC.



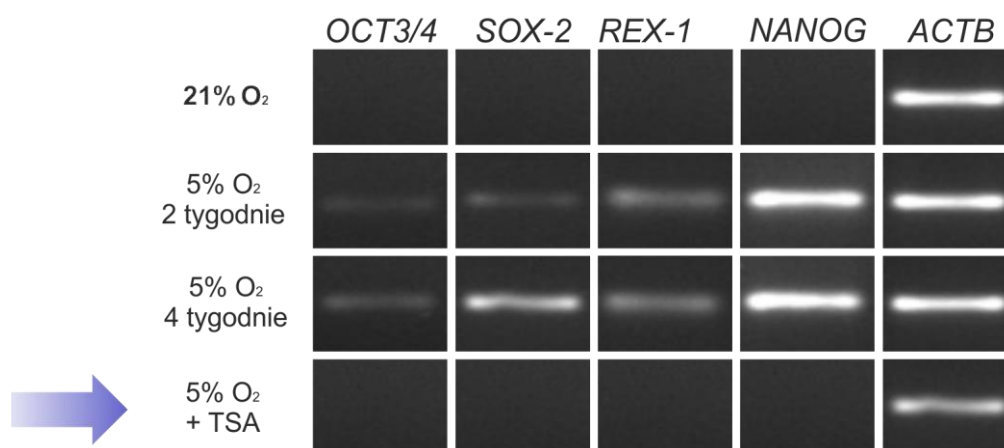
Ryc. 31. Analiza ekspresji mRNA genów HIF-1 α i HIF-2 α . Wykres przedstawia wyniki względnej ekspresji HIF-1 α i HIF-2 α uzyskane metodą $\Delta\Delta C_t$ (qRT-PCR) z zastosowaniem sond hybrydacyjnych TagMan w komórkach WJ-MSC, WJ-MSC_{NT} oraz z zastosowaniem różnych dawek inhibitora TSA (100 nM, 200 nM). Każda z prób normalizowana była w stosunku do genu referencyjnego β -AKTYNY oraz przeanalizowana względem próby kalibratora. Wpływ TSA na ekspresję genów HIF-1 α i HIF-2 α - dodanie inhibitora (TSA) skutkowało obniżeniem ekspresji obydwu analizowanych transkryptów genów HIF-1 α i HIF-2 α . Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie (\pm SD) z trzech doświadczeń. Istotność statystyczna przeanalizowana dla poszczególnych genów względem próby z 21% tlenu, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

5.6.5. Indukcja ekspresji genów pluripotencjalnych w komórkach WJ MSC_{NT}

Obserwacje hodowli komórek MSC w obniżonym do 5% stężeniu tlenu wykazały, że zastosowane warunki są ważnym czynnikiem wpływającym również na ekspresję genów związanych z pluripotencjalnością. Odnotowano wzrost mRNA genów charakterystycznych dla komórek zarodkowych SRTF (ang. *Stemness-Related Transcriptional Factors*). Wyniki przeprowadzonych badań ujawniły, że komórki WJ-MSC_{NT} wykazują ekspresję mRNA całego wskazanego zestawu tych genów: Oct3/4 i Nanog, Sox2, Rex, (Drela i wsp.2014) (ryc. 32).

Opierając się na danych literaturowych opisujących wpływ Trichostatyny A (TSA) na mechanizmy epigenetyczne związane z różnicowaniem komórek, podjęto próbę oceny wpływu tego modyfikatora acetylacji histonów na charakterystykę WJ-MSC_{NT}.

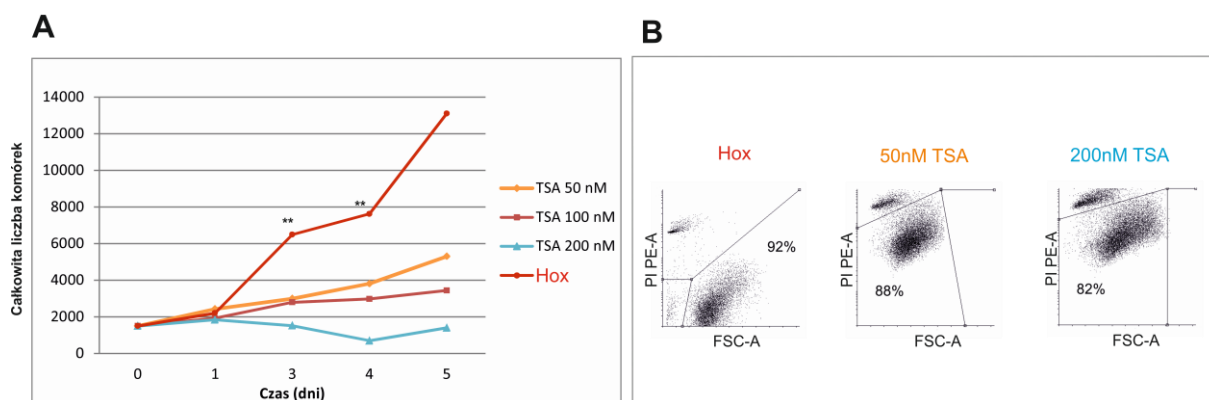
Wykazano, że w badanym układzie doświadczalnym w komórkach WJ-MSC_{NT} po dodaniu TSA (200 nM) poza znamienym zmniejszeniem ekspresji genów HIF całkowitej blokady uległa również ekspresja genów SRTF (Oct3/4, Sox, Rex, Nanaog) (ryc. 32-strzałka).



Ryc. 32. Produkty reakcji RT-PCR dla genów pluripotencjalnych (Oct3/4 i Nanog, Sox2 i Rex1) w komórkach WJ-MSC_{NT} hodowanych w warunkach 5 % stężenia tlenu oraz komórek WJ-MSC z warunków standardowych (21%O₂). Jako gen referencyjny zastosowano β -Aktynę (ACTB). Ekspresja genów Oct3/4, Nanog oraz Sox2 i Rex1 pojawia się począwszy od drugiego tygodnia hodowli w warunkach 5% tlenu. Ulega całkowitemu zablokowaniu po dodaniu TSA (200 nM).

5.6.6. Wpływ TSA na proliferację WJ-MSC_{NT}

Wstępne obserwacje wykazały, że komórki potraktowane Trichostatyną A, zależnie od dawki zmniejszały tempo proliferacji, nie uzyskując pełnej konfluencji. Ustalono efektywną dawkę hamującą proliferację dla hodowli komórek WJ-MSC_{NT} w zakresie stężeń TSA od 50 nM do 200 nM. Rycina 33 przedstawia krzywe wzrostu komórek WJ-MSC_{NT} sporządzone na podstawie krzywej wzorcowej z odczynnikiem WST1 bez TSA oraz w obecności badanego związku. W hodowlach kontrolnych obserwowano intensywny, prawie 10-krotny w stosunku do ich początkowej liczby, wzrost komórek żywych w czasie 5 dni. Obecność inhibitora deacetylazy - TSA: 50 nM, 100 nM, 200 nM obniżała liczbę żywych komórek odpowiednio o około 50% w obecności 50 nM i 75% w obecności 100 nM TSA. Wysoka dawka 200 nM TSA prawie całkowicie blokowała proliferację. Dla potwierdzenia żywotności komórek i braku efektu cytotoksycznego TSA w zastosowanych stężeniach wykonano badania cytometryczne z jodkiem propidyny. Wykazano żywotność na poziomie 82% i 88% w przypadku kolejno najwyższej i najniższej dawki TSA w porównaniu z 92% żywotnością w komórkach kontrolnych.

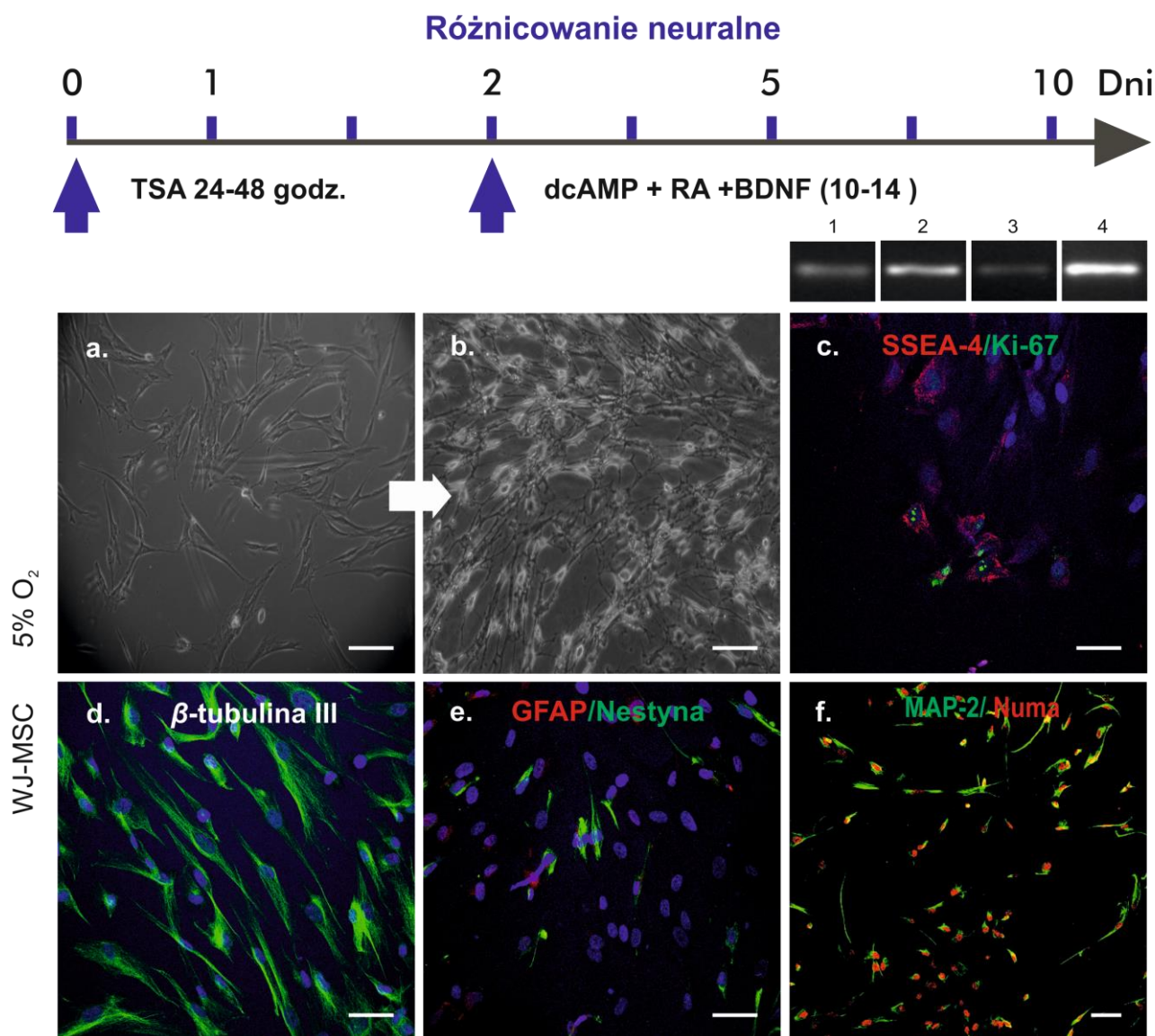


Ryc. 33. Badanie cytotoksyczności inhibitora HDACi (Trichostatyny A). Wpływ zależny od dawki TSA (50 nM, 100 nM, 200 nM) na tempo proliferacji (A) oraz przeżywalność (B) komórek WJ-MSc - detekcja liczby żywych komórek w reakcji z jodkiem propidyny. Wykres obrazuje procent liczby komórek żywych po 7 dniach hodowli w warunkach 5% tlenu. Każda wartość jest średnią (\pm SD) z trzech niezależnych eksperymentów, ** $p < 0,01$.

5.6.7. Indukcja różnicowania neuralnego w komórkach WJ-MSc_{NT}

Analizę potencjału różnicowania wykonano na komórkach WJ-MSc_{NT} rosnących w warunkach 5% stężenia tlenu w postaci charakterystycznej dla hodowli monowarstwy. W celu zbadania potencjalnych możliwości do różnicowania neuralnego, komórki WJ-MSc_{NT} wykazujące stabilne cechy komórek niezróżnicowanych zostały umieszczone w wybranych pożywkach rekomendowanych w literaturze jako różnicujące. Komórki inkubowano przez okres od 7 do 14 dni w pożywkach zawierających różne kombinacje czynników stymulujących różnicowanie neuralne. Dokładne podsumowanie składu testowanych pożywek i związków przedstawia tabela 4 umieszczona w rozdziale 4.5. Nie zaobserwowano istotnego wpływu pożywek suplementowanych neuromorfofenami i czynnikami neurotroficznymi na zmiany morfologiczne charakterystyczne dla komórek neuralnych, co świadczyło o braku powodzenia procesu różnicującego. Zauważono natomiast, że pożywki z dodatkiem dBcAMP powodowały paradoksalnie intensywny wzrost tempa proliferacji hodowli niezależnie od pierwotnie zastosowanej gęstości komórkowej. Pozytywną odpowiedź różnicującą uzyskano jedynie po wstępnej suplementacji hodowli przez TSA (200 nM) a następnie zastosowanie badanych czynników stymulujących neurogenezę: dBcAMP, kwasu retinowego (RA) oraz mózgowego czynnika wzrostu nerwów (BDNF) w stężeniach podanych w tabeli 4 (rozdział 4.5). Po 10 dniach hodowli w obecności kombinacji tych morfofenów i czynników neurotroficznymi komórki zaczynały wykazywać zróżnicowaną wielowypustkową morfologię przypominającą charakterystyczną sieć neuronową. Równolegle obserwowano zanik typowego fenotypu komórek mezenchymalnych o fibroblastycznej morfologii oraz wydatne zmniejszenie tempa

prolifracji, objawiające się zmniejszeniem liczby komórek Ki-67⁺ pozytywnych oraz markerów komórek nisko zróżnicowanych SSEA-4 i nestyny (ryc. 34.)



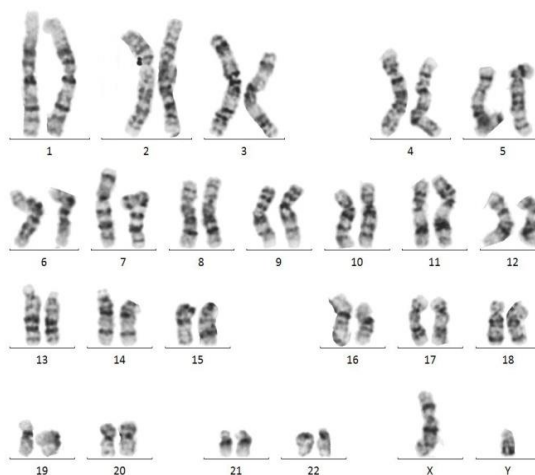
Ryc. 34. Analiza różnicowania neuralnego komórek WJ-*MSC_{NT}* rosnących w charakterystycznej hodowli jednowarstwowej (a) z zastosowaniem protokołu opartego o wcześniejsze traktowanie TSA 200 nM w połączeniu z morfogenami dbcAMP, RA, BDNF. Zaobserwowane zmiany morfologii - charakterystyczna sieć komórek wielowypustkowych (b). Analiza immunocytochemiczna markerów typowych dla komórek niezróżnicowanych SSEA-4 (c), nestyna (e) oraz dojrzałych neuronów β -tubuliny III (d) MAP2 (f). Skala 50 μ m. Jądra komórkowe wybarwione Hoechst 33258 (niebieski) lub Numa (czerwone). Produkty reakcji RT-PCR dla genów 1-MAP2, 2-NF200, 3-NeuroD, 4- β -aktyny

To prawdopodobnie może wskazywać na opuszczenie przez komórki cyklu podziałowego i wejście w końcowy etap różnicowania, potwierdzony następnie ekspresją markera zróżnicowania końcowego neuronów, antygenu MAP2. Co znaczące, nie zaobserwowano tutaj komórek pozytywnych pod względem ekspresji antygenu GFAP w komórkach o neuralnej

morfologii. W celu potwierdzenia neuronalnego kierunku różnicowania hodowli komórek WJ-MSC_{NT} po „primingu” TSA, poza charakterystyką fenotypową określono również ekspresję genów charakterystycznych dla zróżnicowanych neuronów. Wykazano, że w komórkach traktowanych mieszaniną różnicującą ekspresji ulegały geny typowe dla późnej fazy różnicowania neuronalnego. Zaobserwowano obecność transkryptów mRNA dla NF200, MAP2 i NeuroD. Natomiast wynik uzyskany na podstawie analizy obecności mRNA dla genu GFAP nie był w badaniach jednoznaczny, ponieważ jego ekspresja została zaobserwowana tylko w jednej próbie na trzy badane doświadczenia.

5.6.8. Analiza kariotypu komórek WJ-MSC_{NT} po ich długotrwałej hodowli w warunkach obniżonego do 5% stężenia tlenu

Analiza cytogenetyczna przeprowadzona w celu potwierdzenia względnej stabilności genotypu odróżnicowanych komórek WJ-MSC_{NT} w czasie hodowli *in vitro* wykazała zachowanie prawidłowego, zrównoważonego kariotypu po ponad 2 miesięcznej hodowli komórek w obniżonym do 5% stężeniu tlenu. Mimo zaobserwowanych cech odróżnicowania oraz wydatnie zwiększonej (lecz stabilnej) proliferacji komórek, nie wykazano żadnych zaburzeń cytogenetycznych w liczbie i strukturze chromosomów (ryc. 35).



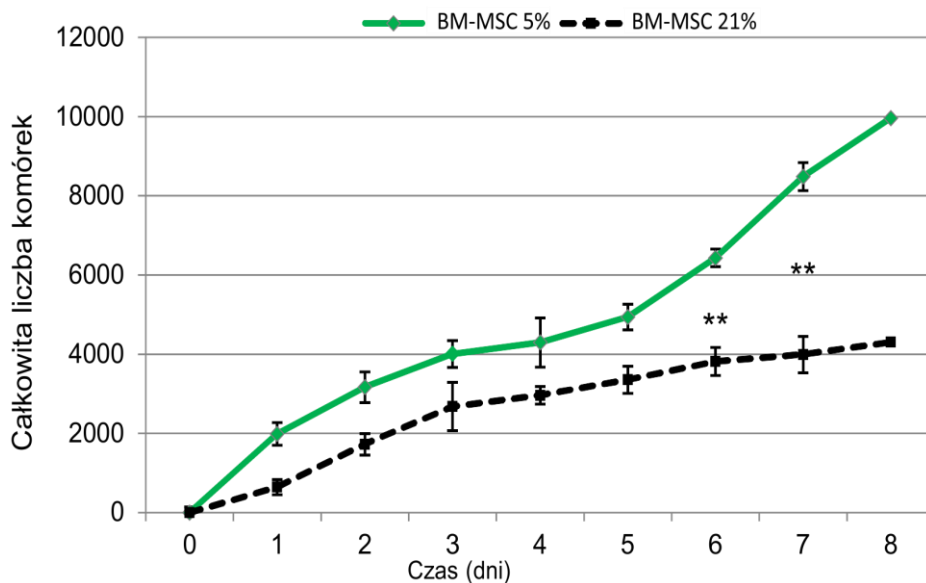
Ryc. 35. Analiza kariotypów komórek po 2 miesięcznej hodowli w warunkach 5% stężenia tlenu. Komórki WJ-MSC_{NT} mimo cech odróżnicowania i przyspieszonej proliferacji zachowywały prawidłowy kariotyp. Obraz reprezentatywny dla 3 niezależnych eksperymentów.

5.7. Wpływ obniżonego stężenia tlenu 5% na komórki BM-MS_{CNT}

W kolejnej części doświadczeń przeanalizowano wpływ warunków obniżonego do 5 % stężenia tlenu na komórki mezenchymalne izolowane ze szpiku kostnego. Zachowując takie same parametry eksperymentu BM-MS_C po wyizolowaniu ze szpiku kostnego początkowo przez dwa pasaże hodowane były w standardowej atmosferze tlenu, a następnie przekładane do warunków z obniżoną zawartością tlenu (5%). Następnie BM-MS_{CNT} hodowane były przez kolejne 2 miesiące. Jedną z pierwszych obserwacji był brak istotnych różnic w morfologii komórek z hodowli w 5% stężeniu tlenu w porównaniu do komórek kontrolnych utrzymywanych w atmosferycznej zawartości tlenu. Nie wykazano obecności centrów intensywnej proliferacji takich jak w komórkach WJ-MS_{NT}. Zaobserwowano jedynie pojedyncze struktury przypominające skupiska lub agregaty, które tak jak w przypadku warunków atmosferycznych nie zwieryły miejsc intensywnej proliferacji – były negatywne pod względem zwiększonej obecności jądrowego antygenu proliferacji Ki67.

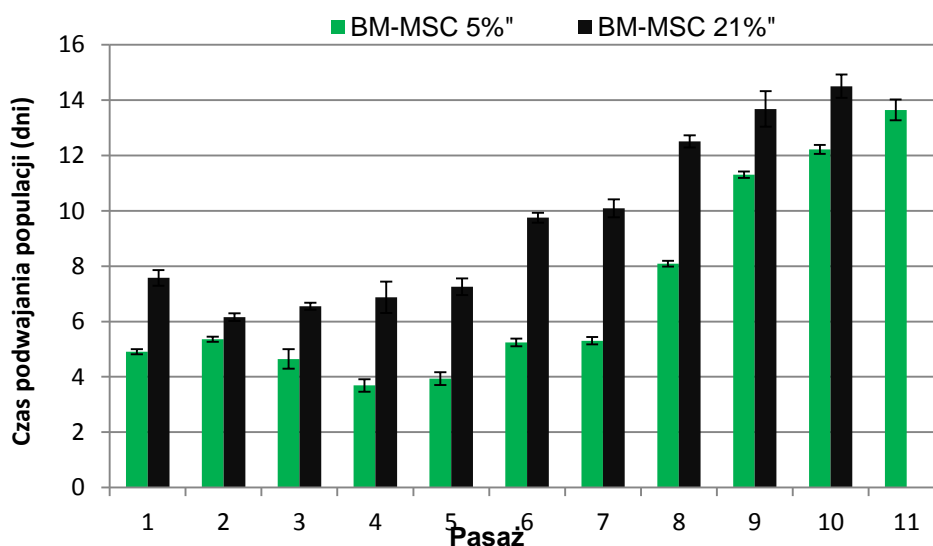
Zastosowane testy proliferacji oparte na krótkoterminowej oraz długoterminowej analizie hodowli BM-MS_{CNT} w warunkach 5% stężenia tlenu wykazały, że MSC izolowane ze szpiku reagują na obniżenie stężenia tlenu jedynie umiarkowanym zwiększeniem tempa proliferacji.

W krótkoterminowej ocenie proliferacji BM-MS_{CNT} zastosowano metodę polegającą na pomiarze szybkości redukcji odczynnika WST-1. W oparciu o sporządzoną krzywą wzorcową określającą liczbę żywych komórek wykazano statystycznie istotnie większy przyrost komórek w grupie BM-MS_{CNT} w porównaniu do standardowej hodowli (ryc. 36). Siódmego dnia pomiaru odnotowano ponad dwukrotnie większą ilość komórek, wynoszącą odpowiednio 4078 (\pm) dla BM-MS_C oraz 8290 (\pm) dla BM-MS_{CNT}.



Ryc. 36. Wpływ warunków obniżonego stężenia tlenu (5% O₂) na proliferację komórek BM-MSC. Tygodniowa analiza proliferacji z zastosowaniem odczynnika WST-1. Punkty stanowią średnie \pm SD dla trzech niezależnych doświadczeń. ** $p < 0.01$

Podobną reakcją na obniżenie stężenia tlenu odnotowano w ustalonej fazie wzrostu hodowli długoterminowej (do ok. 8 pasaży). Starsze hodowle reagowały stopniowym wydłużeniem czasu podwojenia populacji w pasażach starszych ze zmniejszaniem w zależności od warunków tlenowych (ryc. 37).



Ryc. 37. Wpływ warunków obniżonego stężenia tlenu (5% O₂) na proliferację komórek BM-MSC. Wykres przedstawiający czas podwojenia populacji- PDT od 1 do 11 pasaży. Punkty stanowią średnie (\pm SD) z trzech eksperymentów.

W kolejnych etapach doświadczenia przeanalizowano wpływ obniżonych warunków tlenu na różnicowanie komórek wraz z analizą ekspresji genów SRTF. Uzyskane wyniki wykazały, że komórki izolowane ze szpiku nie reagują w sposób podobny do zaobserwowanego w komórkach uzyskanych z galarety Whartona. Nie wykazują indukcji ekspresji genów STF (Oct3/4, Nanog, Sox2, Rex1) na żadnym z analizowanych etapów hodowli (2 tygodnie, 1 miesiąc, 2 miesiące).

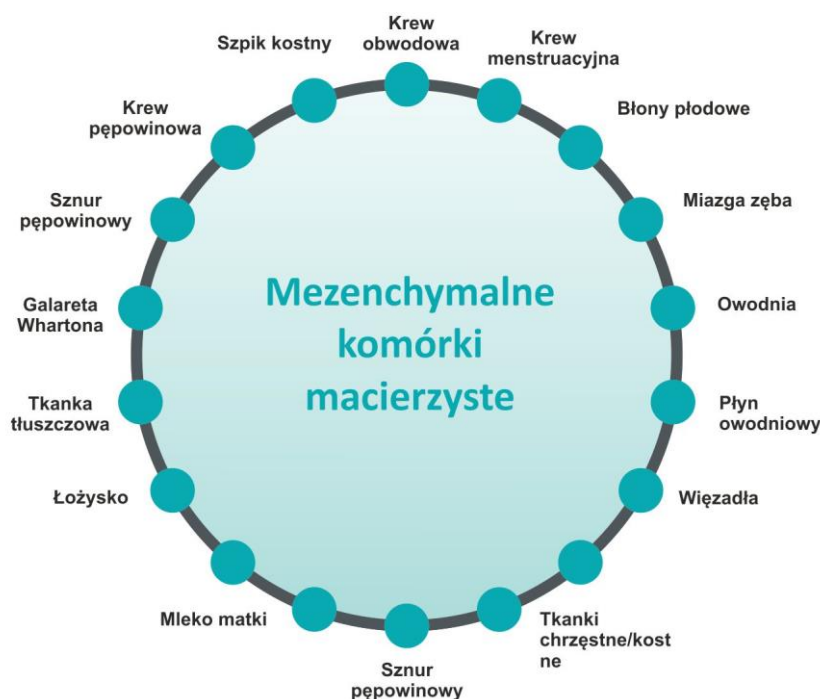
6. DYSKUSJA

6.1. Izolacja i optymalizacja warunków hodowli *in vitro* mezenchymalnych komórek macierzystych

Jednym z głównych celów pracy doktorskiej było opracowanie metod i porównanie wyników izolacji mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z różnych źródeł tkankowych: krwi pępowinowej, galarety Whartona sznura pępowinowego oraz szpiku kostnego. Ma to szczególne znaczenie w świetle licznych wymogów dotyczących stosowania terapii autologicznymi MSC pochodzącymi z własnych tkanek pacjenta (szpik kostny) lub alternatywnie komórkami allogenicznymi, pochodzącymi z tkanek płodowych (krew pępowinowa i galareta Whartona) o znacznie obniżonej immunogenności (Lee i wsp., 2014). Według aktualnych danych literaturowych komórki o cechach MSC można wyizolować prawie z każdej tkanki (ryc. 38) jednak pod kątem zastosowania w medycynie regeneracyjnej istnieje konieczność uzyskania względnie dużej liczby komórek znajdujących się na odpowiednim etapie rozwojowym. W przypadku różnych jednostek chorobowych wymagane jest jednorazowe przeszczepienie nawet do 200 milionów komórek jednemu pacjentowi (Hare i wsp., 2012, Connick i wsp., 2012). Uzyskanie tak dużej liczby mezenchymalnych komórek macierzystych podczas jednorazowego pobrania materiału jest niemożliwe. Optymalizacja warunków hodowli *in vitro*, umożliwiającej uzyskanie pożądanej liczby komórek regeneracyjnych, jest więc kluczowym zagadnieniem biotechnologicznym. Tym bardziej, że korzystne efekty transplantacji mezenchymalnych komórek macierzystych namnożonych w hodowli *in vitro* zaobserwowano w wielu jednostkach chorobowych m.i. w regeneracji układu chrzęstno-kostnego (Marcacci i wsp., 2007; Wakitani i wsp., 2011), mięśnia sercowego oraz w terapii uszkodzenia rdzenia kręgowego (Wang i wsp., 2012; Kishk i wsp., 2010).

Pierwszym i najczęściej stosowanym klinicznie rodzajem MSC jest populacja izolowana ze szpiku kostnego. Przeszło 40 lat temu Friedenstein wyizolował populację komórek o morfologii fibroblastów, które tworzyły kolonie i wykazywały cechy wielokierunkowego różnicowania mezodermalnego (Friedenstein i wsp., 1976). Szpik kostny jest do tej pory głównym źródłem mezenchymalnych komórek macierzystych dla celów klinicznych jednak jego pozyskanie wiąże się z inwazyjną procedurą pobierania, a liczba otrzymanych komórek jest stosunkowo niewielka. W obecnej literaturze istnieje wiele protokołów izolacji i hodowli MSC ze szpiku kostnego. W pierwszej kolejności procedury izolacji opierają się na uzyskaniu frakcji komórek jednojądrzastych w wyniku wirowania w gradiencie gęstości w komercyjnie dostępnych roztworach umożliwiających rozdział komórek. Następnie, wykorzystując właściwości przylegania komórek do podłoża lub rozpoznania

immunologicznego antygenów powierzchniowych, selekcjonuje się populacje komórek mezenchymalnych. W przypadku szpiku kostnego najwyższą wydajność w izolacji komórek MSC uzyskano stosując wstępnie gradient Ficollu. Badania ostatnich lat wskazują ponadto, że procedura izolacji komórek ze szpiku kostnego wpływa również na liczbę i jakość uzyskiwanych komórek MSC. Udowodniono, że skuteczność izolacji na Ficollu jest dużo wyższa w porównaniu z innymi komercyjnie dostępnymi gradientami. Jednak otrzymana przez nas populacja komórek MSC ze szpiku kostnego była stosunkowo nieliczna w porównaniu z kolejno analizowaną tkanką galarety Whartona. Uzyskana przez nas liczba komórek BM-MSC wynosiła około 0,02% wszystkich komórek wyizolowanych pierwotnie, co jest zgodne z innymi doniesieniami literaturowymi (Pittenger i wsp., 1999). Uważa się, że na liczbę uzyskanych komórek BM-MSC może wpływać miejsce anatomiczne, z którego zostały one pobrane oraz wiek pacjenta. W wielu niezależnych badaniach wykazano, że liczba komórek MSC jest wyższa u ludzi młodszych (D'Ippolito i wsp., 1999; Stolzing i wsp., 2008). Uważa się, że liczebność tych komórek jak również ich zdolność do różnicowania, drastycznie maleją wraz z wiekiem dawcy (Stenderup i wsp., 2003). Sugeruje to, że zastosowanie komórek pochodzących od pacjentów w podeszłym wieku może być mniej skuteczne klinicznie. Dlatego poszukiwanie alternatywnych źródeł, z których można wyizolować komórki MSC do stosowania w układzie allogenicznym jest przedmiotem intensywnych badań (Jin i wsp., 2013).



Ryc. 38. Źródła tkankowe mezenchymalnych komórek macierzystych.

Pod tym względem na szczególną uwagę zasługują tkanki, które pozostają po porodzie, włączając w to łożysko, krew pępowinową, błony płodowe oraz sznur pępowinowy. Są to łatwo dostępne źródła MSC, które nie budzą kontrowersji etycznych (Moretti i wsp., 2010) oraz nie wiążą się z inwazyjną procedurą pobierania. Ponadto uważa się, że głównie tkanki o cechach płodowych mogą zawierać większą pulę komórek progenitorowych znajdujących się na niższym etapie zróżnicowania, a więc charakteryzujących się zwiększoną plastycznością. Komórki macierzyste uzyskane z tkanek niedojrzałych wykazują także większy potencjał proliferacyjny w porównaniu z dorosłymi komórkami macierzystymi. Szybsze tempo podziałów oraz mniejsza dojrzałość popłodowych komórek macierzystych korelują z obecnością w tych komórkach dłuższych odcinków telomerowych, będących skutkiem zwiększonej aktywności telomerazowej charakterystycznej dla komórek macierzystych (Ninagawa i wsp., 2011). Polecaną przez wielu badaczy tkanką, z której w dość łatwy sposób można uzyskać stosunkowo wysoką liczbę różnego rodzaju komórek progenitorowych jest badana przez nas galareta Whartona. Uważa się, że wydajność uzyskania mezenchymalnych komórek macierzystych z galarety Whartona sznura pępowinowego jest dużo większa w porównaniu z krwią pępowinową badaną od wielu lat w naszym zespole (Zeddou i wsp., 2010; Bużańska i wsp., 2002, 2006). Podobnych obserwacji dostarczyły wyniki własnych doświadczeń prezentowanych w tej rozprawie, które wykazały, że spośród przebadanych tkanek najkorzystniejszą do pozyskania populacji mezenchymalnych komórek macierzystych jest galareta Whartona. Ze wszystkich badanych fragmentów świeżej tkanki sznurów pępowinowych udało się wyizolować populację komórek o charakterystycznych cechach MSC (15/15) i wysokim potencjale proliferacyjnym.

Pomimo, że krew pępowinowa jest uznanym i idealnym źródłem otrzymywania hematopoetycznych komórek macierzystych/progenitorowych do repopulacji szpiku, to jednak według niektórych badaczy jest kwestionowana jako wydajne źródło mezenchymalnych komórek macierzystych (Mareschi i wsp., 2001). W naszych badaniach porównawczych krew pępowinowa okazała się również najmniej korzystnym źródłem do izolacji mezenchymalnych komórek macierzystych. Mimo zastosowania wielu modyfikacji polecanych w literaturze protokołów izolacyjnych, uzyskanie spełniającej wymagane kryteria (Dominici i wsp., 2006) populacji mezenchymalnych komórek macierzystych ograniczyło się tylko do jednego przypadku na ogólną liczbę 15 przeprowadzonych izolacji (1/15). Jednak pomimo niewielkiej liczby wyizolowanych komórek o cechach MSC stwierdzono, że krew pępowinowa zawiera inne istotne terapeutycznie komórki macierzyste/progenitorowe. Frakcja komórek jednojądrzastych otrzymana metodą gradientu gęstości i pozbawiona komórek CD3, CD14, CD19, CD38, CD66b, w początkowych etapach hodowli *in vitro* wykazywała wyraźną ekspresję genów typowych dla obecności komórek o charakterze pluripotencjalnym: Oct3/4, Sox2, Rex1 oraz Nanog. Podobnych obserwacji dostarczyły wcześniejsze badania naszego

Zespołu (Habich i wsp., 2006), w których zidentyfikowano w krwi pępowinowej pulę nieodróżnionych komórek o charakterze zarodkowym. Opisana frakcja charakteryzowała się brakiem antygenu powierzchniowego komórek hematopoetycznych CD34 oraz posiadała samoistną zdolność do różnicowania w komórki o potencjale neuralnym (Nestyna) przy braku markerów liniowych mezodermalnych i endodermalnych (Habich i wsp., 2011).

Standardowa preparatyka subpopulacji komórek jednojądrzastych krwi pępowinowej jest procesem wieloetapowym, obejmującym początkową izolację komórek w wyniku wirowania w gradiencie gęstości oraz stopniowego selekcjonowania subpopulacji MSC w czasie dalszej hodowli *in vitro* z wykorzystaniem właściwości przylegania komórek do plastiku. Pierwotna frakcja komórek jednojądrzastych zostaje pozbawiana komórek z różnych linii rozwojowych na podstawie immunodetekcji specyficznych antygenów powierzchniowych metodą sortowania magnetycznego MACS (ang: *Magnetic - Activated Cell Sorting*). W zastosowanej przez nas metodyce selekcja opierała się na wyeliminowaniu komórek CD3, CD14, CD19, CD38, CD66b pozytywnych z zastosowaniem komercyjnego zestawu przeciwciał Rosettesep (rozdział 3.3). Liczba uzyskiwanych w ten sposób komórek macierzystych/progenitorowych zależała przede wszystkim od ilości pobranej krwi ale także pośrednio od takich czynników jak: wielkość łożyska i naczyń, długość sznura pępowinowego oraz czasu krzepnięcia krwi. Krew pępowinową można pobierać zarówno podczas porodu odbywającego się siłami natury jak i podczas cesarskiego cięcia. W zależności od sposobu pobierania można uzyskać do 220 ml krwi pępowinowej. W celu zwiększenia efektywności otrzymywania mezenchymalnych komórek macierzystych z krwi pępowinowej starano się ustalić niezbędne kryteria ich izolacji (Bieback i wsp., 2004). Według tych autorów jednostki krwi pępowinowej, z których udaje się otrzymać frakcję komórek MSC powinny zawierać powyżej 33 ml krwi (w tym co najmniej 10^8 komórek jednojądrzastych) oraz zostać wyizolowane w przeciągu 15 godzin od momentu pobrania. Jednak najnowsze doniesienia sugerują, że nawet powyższe kryteria nie są wystarczające do wydajnej izolacji komórek MSC. Dlatego opracowano protokół izolacji komórek MSC zawierający dodatkowe, jeszcze bardziej restrykcyjne wymagania dla jednostek pobraniowych (czas ≤ 2 godzin oraz objętości ≥ 90 ml) (Zhang i wsp., 2011). Praca Zhang udowadnia, że w przypadku zastosowania takich zasad selekcji można osiągnąć nawet 90% skuteczność w pozytywnych izolacjach komórek MSC z krwi pępowinowej. Ze względu na tak wysokie wymagania proceduralne stawiane izolacji krwi pępowinowej w konkluzji można stwierdzić, że krew pępowinowa jest niezwykle trudnym źródłem do pozyskania względnie oczyszczonej frakcji komórek MSC (Zeddou i wsp., 2010). Istnieją również wątpliwości czy komórki mezenchymalne występujące w tak znikomych i różnych ilościach w krwi pępowinowej nie są komórkami sztucznie wtłoczonymi do krwi ze sznura pępowinowego w trakcie manipulacji w czasie porodu lub samego pobierania materiału z łożyska. Być może również płynne środowisko krwi pępowinowej nie jest korzystne dla

charakteryzujących się adhezją komórek o fenotypie mezenchymalnym i dlatego też procedura preparatyki powinna być maksymalnie skrócona. Należy zaznaczyć, że licznym badaczom nie udało się potwierdzić obecności wydajnej populacji komórek macierzystych o cechach mezenchymalnych w izolatach z krwi pępowinowej, co w pełni pokrywa się z naszymi doświadczeniami (Mareschi i wsp., 2001; Zhang i wsp., 2011). Dlatego też dla celów terapeutycznych stosuje się bardzo często nieselekcyjowaną frakcję komórek jednojądrzastych (MNC) krwi pępowinowej, zawierającą m.in. heterogenną populację komórek macierzystych/progenitorowych, prezentujących również wykazane przez nas cechy komórek niezróżnicowanych oraz potwierdzony w wielu badaniach eksperymentalnych, wysoki potencjał (neuro) regeneracyjny (Achyut i wsp., 2014; Paczkowska i wsp., 2013).

Należy pamiętać, że w przeciwieństwie do hematopoetycznych komórek macierzystych, do tej pory nie znaleziono specyficznego markera dla komórek o cechach MSC. W 2006 roku Towarzystwo Terapii Komórkowej (ISCT), starając się zdefiniować podstawowe kryteria dla komórek MSC wytyczyło zasady identyfikacji tych komórek (Dominici i wsp., 2006). Jednak w miarę postępu badań okazuje się coraz wyraźniej, że te cechy (stosowane markery) są mało specyficzne i wspólne dla fibroblastów, pericytów a nawet komórek hematopoetycznych (Boxall i wsp., 2012; Lupatov i wsp., 2015). Publikowane są również dane z których wstępnie wynika, że selekcjonowanie komórek MSC o różnym pochodzeniu tkankowym uda się w końcu oprzeć na bardziej selektywnej ekspresji nowych, specyficznych dla nich cząsteczek powierzchniowych CD (Kaltz i wsp., 2010; Alvarez-Viejo i wsp., 2015).

Zgodnie z ustalonymi przez ISCT w 2006 wytycznymi, wszystkie badane przez nas komórki (WJ-MS, BM-MS, UCB-MS) spełniały podstawowe kryteria przynależności do grupy MSC. Po pierwsze w warunkach hodowli *in vitro* były wrzecionowatymi, przylegającymi do podłoża, podobnymi do fibroblastów komórkami, które stopniowo zarastały całą dostępną powierzchnię naczynia hodowlanego tworząc jednolitą hodowlę zlewną (ang. *monolayer*). Ponadto wykazano w nich podobny wzór ekspresji typowych, komercyjnie polecanych markerów mezenchymalnych (CD73, CD90, CD105, CD106) potwierdzony badaniami immunocytochemicznymi, cytometrią przepływową oraz w badaniach RT-PCR na poziomie ekspresji genów. W przeprowadzonych badaniach nie wykazano natomiast istotnych różnic w oznaczonym profilu markerów mezenchymalnych pomiędzy badanymi populacjami komórek pochodzących z różnych źródeł jak również nie zaobserwowano zmian ich ekspresji w trakcie trwania hodowli.

Należy jednak podkreślić, że wiele badań koncentruje się na zagadnieniach związanych z niepełną charakterystyką różnych populacji komórek MSC i ich zachowaniem w zmiennych warunkach hodowli *in vitro*. Dane literaturowe nadal nie określają jednoznacznie czy populacje MSC pochodzące z różnych tkanek zawierają identyczne komórki macierzyste,

które różnią się jedynie stopniem heterogenności, czy jednak powinny zostać wyodrębnione i rozpatrywane jako niezależne rodzaje komórek macierzystych/progenitorowych w zależności od ich tkankowego pochodzenia. Przykładem mogą być wyniki pracy, w której badacze sugerują konieczność zastosowania określonych typów komórek MSC w zależności od rodzaju leczonych jednostek chorobowych (Jin i wsp., 2013, Melief i wsp., 2013).

Trudności spowalniające rozwój terapii komórkowej dotyczą również niewystarczającej znajomości podstawowych mechanizmów regulujących proliferację, przeżycie oraz ukierunkowane różnicowanie mezenchymalnych komórek macierzystych zarówno *in vitro* jak i po ich przeszczepie. Biorąc pod uwagę zmienność fenotypową hodowli *in vitro* to każdorazowa przedtransplantacyjna charakterystyka komórek może okazać się konieczna w klinicznym stosowaniu tych terapii.

Badania stanowiące przedmiot mojej rozprawy doktorskiej koncentrowały się na uzyskaniu jak najpełniejszej informacji na temat podobieństw i różnic mezenchymalnych komórek macierzystych uzyskiwanych z tkanek niedojrzałych (popłodowych) oraz z tkanki dorosłej (szpik kostny), z jednoczesnym zachowaniem ustalonych parametrów izolacji i hodowli *in vitro*. Populacje komórek przeanalizowano w kontekście zmian morfologii, immunofenotypu i występowaniem kolonii CFU, będących według niektórych badaczy, najlepszym wykładnikiem „macierzystości” badanej frakcji (Choumerianou i wsp., 2010). Oceniano właściwości plastyczne oraz zdolności do wielokierunkowego różnicowania komórek, w tym również ich potencjał proneuralny. Na podstawie otrzymanych wstępnych wyników badań komórki uzyskane z krwi pępowinowej zostały wykluczone z bardziej zaawansowanych analiz porównawczych ze względu, jak opisano powyżej, na zbyt niską wydajność izolacji komórek o potwierdzonym fenotypie mezenchymalnym.

6.2. Analiza porównawcza wzrostu i morfologii MSC pochodzących z tkanki dojrzałej i tkanki popłodowej w warunkach standardowych *in vitro*.

Prezentowane w publikacjach innych autorów zagadnienia dotyczące proliferacji i starzenia komórek MSC wciąż budzą wiele kontrowersji. W celu uzyskania licznej populacji pożądaných komórek bez cech starzenia istniejąca metodologia ekspansji i synchronizacji komórek musi być zoptymalizowana. Wielu badaczy sugeruje zastosowanie różnych modyfikacji parametrów hodowli pozwalających na ustalenie najbardziej skutecznego standardu hodowli *in vitro* komórek MSC do użytku klinicznego. W celu uzyskania pożądanęj liczby MSC bez cech starzenia niektórzy badacze polecają zastosowanie hodowli trójwymiarowych 3D, co ma zwiększać wydajność proliferacji (Habich i wsp., 2011; Frith i wsp., 2010; Papadimitropoulos i wsp., 2014; Hoch i wsp., 2014).

Na podstawie dostępnych doniesień w literaturze można stwierdzić, że opisywane analizy proliferacji są korzystniejsze dla komórek MSC pochodzących z tkanek niedojrzałych (Hass i wsp., 2011). W wielu niezależnych pracach wykazano, że komórki z tkanek mniej dojrzałych wliczając w to tkanki płodu, wolniej się starzeją niż hodowle MSC pochodzących z tkanek dorosłego organizmu (Hass i wsp., 2011). Praca zespołu Lu, w której autorzy porównywali komórki MSC wyizolowane ze sznura pępowinowego oraz szpiku kostnego udowadnia, że potencjał proliferacyjny komórek bezpośrednio zależy od dojrzałości tkanki. Zaobserwowano prawie dwukrotnie dłuższy czas podwajania populacji w komórkach pochodzących ze szpiku w porównaniu do komórek ze sznura pępowinowego (Lu i wsp., 2006). Obserwacja ta wpisuje się również w podawaną przez innych autorów negatywną korelację pomiędzy potencjałem proliferacyjnym komórek mezenchymalnych a wiekiem dawcy (Beane i wsp., 2014). Podobnych obserwacji dostarczyły wyniki naszych badań, w których na podstawie długoterminowej analizy hodowli MSC w warunkach *in vitro* wykazano dużo dłuższy czas podwajania populacji dla komórek wyizolowanych ze szpiku kostnego. Średni czas PDT na przełomie wczesnych pasaży wynosił 2,53 dni dla WJ-MSK oraz odpowiednio 6,87 dla BM-MSK. Następnie w trakcie kolejnych pasaży (od 5 do 10), wartość czasu podwajania populacji zachowywała podobną tendencję, będącą prawie dwukrotnie wyższą dla BM-MSK. W tym samym eksperymencie odnotowano, stosując metodę analizy proliferacji opartą o aktywność metaboliczną komórek z odczynnikiem WST-1, proporcjonalnie większy przyrost komórek żywych w grupie WJ-MSK.

Analiza morfologiczna hodowli *in vitro* i ocena na podstawie ekspresji Ki67 oraz tworzenia liczniejszych kolonii wykazała, że WJ-MSK we wszystkich badanych grupach dzieliły się szybciej, w porównaniu z komórkami BM-MSK. Zaobserwowano większą liczbę centrów intensywnej proliferacji, które składały się z wielu intensywnie dzielących się komórek charakteryzujących się pozytywną reakcją z markerem proliferacji Ki-67. W toku prowadzonych badań nie zidentyfikowano podobnych struktur w komórkach MSC wywodzących się ze szpiku kostnego. Uważa się, że obecność centrów intensywnej proliferacji jest jedną z głównych cech markerowych macierzystości. Wysoki potencjał proliferacji oraz zdolność tworzenia licznych kolonii przez komórki WJ-MSK może dowodzić istnienia tu zwiększonej proporcji komórek macierzystych w porównaniu do populacji komórek szpiku kostnego. W badaniach opisanych w tej rozprawie pomocny w identyfikacji niezróżnicowanych komórek w obu populacjach okazał się antygen SSEA-4 określający wg. autorów stopień zróżnicowania i stan macierzystości komórek MSC (Riekstina i wsp., 2009; Gang i wsp., 2007). W uzyskanym obrazie immunocytochemicznym identyfikowana populacja MSC z galarety Whartona charakteryzowała się zwiększoną reaktywnością w porównaniu z komórkami pochodzącymi ze szpiku, które zawierały znamienne mniejszą pulę komórek SSEA-4 pozytywnych. Pomimo niższej dojrzałości komórek pochodzących z galarety Whartona hodowanych w

standardowych warunkach tlenowych nie udało się w nich wykazać ekspresji genów pluripotencjalnych. Uważa się, że MSC w warunkach hodowli *in vitro* mogą być pasażowane jedynie ograniczoną ilość razy, co jest bezpośrednio powiązane z zanikiem w nich aktywności telomerazowej (Zimmermann i wsp., 2003). W badaniach własnych wykazano brak ekspresji genu telomerazy począwszy od wczesnych aż do późnych pasażów komórek z obu analizowanych źródeł. W niedawno opublikowanej pracy przedstawiono obserwacje dotyczące populacji mezenchymalnych komórek macierzystych charakteryzujących się aktywnością telomerazy (Ninagawa i wsp., 2011). Jednak kolejne doniesienia były z tą hipotezą sprzeczne. Ponadto w uzyskanym przez nas obrazie immunocytochemicznym na wczesnym etapie hodowli WJ-MSC zidentyfikowano populację pozytywną pod względem markera Brachyury. Ekspresja Brachyury pojawia się we wczesnych etapach rozwoju zarodkowego i bierze udział w specyfikacji mezodermy. Obecność tego markera w zidentyfikowanej populacji może bezpośrednio świadczyć o niższym etapie rozwojowym oraz że badane komórki nie obrały jeszcze sprecyzowanego kierunku liniowego. Wynik ten stanowił kontrast dla obrazu uzyskanego w komórkach BM-MSC, gdzie nie wykazano komórek pozytywnych pod względem Brachyury.

Na uwagę zasługuje obserwacja związana ze zmianą rozmiarów komórek w warunkach hodowli *in vitro*, co ma bezpośredni związek z procesem starzenia hodowli. Wykazano statystycznie znaczące zwiększenie się rozmiarów komórek w czasie hodowli obu typów analizowanych komórek. BM-MSC zwiększały swoją powierzchnię prawie 4 krotnie już na etapie 6 pasażu, natomiast WJ-MSC podobne rozmiary osiągały dopiero na stadium 10-12 pasażu. Powstaje, zatem pytanie czy długa hodowla *in vitro* jest korzystna dla zastosowania klinicznego tych komórek w celu transplantacji. Wykazano mianowicie, że komórki MSC, które pierwotnie są już stosunkowo dużych rozmiarów, po przeszczepieniu mogą zatykać naczynia krwionośne i powodować udary (Ge i wsp., 2014).

Mechanizmy regulujące proliferację MSC w warunkach hodowli *in vitro* nadal nie zostały w pełni poznane i mogą zależeć od wielu zmiennych czynników hodowlanych. Stosowane pożywki mogą różnie wpływać na tempo proliferacji komórek MSC. Ukazały się liczne doniesienia dotyczące optymalnej gęstości wysiewanych komórek oraz preferowanej długości pasażowania. Niektórzy badacze zastanawiają się, czy w celu uzyskania optymalnej liczby komórek powinno stosować się „długie”, czy „krótkie”, pasaży zależne od pierwotniej liczby wysiewanych komórek. Według danych literaturowych, które pokrywają się z naszymi obserwacjami, optymalna gęstość początkowa dla hodowli komórek MSC wynosiła od 2000 do 5000 komórek/cm². Ponadto wykazano, że zatrzymanie tempa podziałów komórkowych w wyniku inhibicji kontaktowej jest uzależnione od rodzaju mezenchymalnych komórek macierzystych (Cordeiro-Spinetti i wsp., 2014). W stosunkowo dużych komórkach MSC izolowanych ze szpiku stwierdzono dużo wcześniejsze zatrzymanie tempa wzrostu w wyniku

kontaktów międzykomórkowych. Na tej podstawie wysnuto wniosek, że hodując BM-MSC należy stosować niższe gęstości. Okazało się, że zagęszczenie MSC w hodowli ma duży wpływ nie tylko na szybkość wzrostu, ale także na morfologię komórek (np. nie udało się uzyskać wzrostu hodowli, gdy MSC były wysiewane z bardzo niską początkową gęstością). Pomimo różnic w dojrzałości komórek pochodzących z obu badanych typów hodowli wykazano, że zarówno szpik kostny jak i galareta Whartona hodowane w warunkach standardowych atmosferycznego stężenia tlenu mogą być użytecznym, aczkolwiek znacznie różniącym się, źródłem mezenchymalnych komórek macierzystych.

Na podstawie danych literaturowych i własnych badań można podjąć próbę rozstrzygnięcia kontrowersyjnego zagadnienia odnośnie potencjalnego zakresu indukowanego zróżnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych *in vitro*. Powstaje pytanie czy MSC są komórkami, które wykazują właściwości multipotencjalne czy również posiadają cechy pluripotencjalności (embryonic-like) oraz czy cechy te występują zarówno w tkankach płodowych jak i dojrzałych poddawanych analizie w przedstawionej pracy. Ogólnie można przyjąć, jak podano w poprzedniej części Dyskusji, że komórki macierzyste tkanek płodowych są bardziej pierwotne fenotypowo niż komórki macierzyste dorosłego organizmu oraz że posiadają większy potencjał do dalszego różnicowania. Zgodnie z aktualnymi danymi, w populacjach pochodzących z galarety Whartona i krwi pępowinowej (ale również z niektórych dorosłych tkanek) stwierdzano występowanie zmiennej puli progenitorów liniowych, w tym również ekspresjonujących geny i białka związane z pluripotencjalnością (Greco i wsp., 2007; Nekanti i wsp., 2010). Jednak rzeczywista transkrypcja genów SRTF w somatycznych komórkach macierzystych stała się kontrowersyjna z chwilą wykazania, że ekspresja pluripotencjalnych czynników transkrypcyjnych, a przede wszystkim genu Oct3/4A (Szade i wsp., 2013), może dawać zafałszowany wynik, związany z obecnością w genomie sekwencji tzw. pseudogenów (Wang i wsp., 2010; Liedtke i wsp., 2008; Jez i wsp., 2014). Okazało się, że w wielu publikacjach opisujących pluripotencjalne właściwości niektórych komórek progenitorowych wykorzystywano wadliwie zaprojektowane primery, dzięki którym powielano sekwencje pseudogenów lub nieprawidłowe izoformy genu Oct3/4 niespecyficzne dla pluripotencji np. tzw. izoformę Oct3/4B. W badaniach braliśmy pod uwagę kwestie metodyczne, zapewniające prawidłową identyfikację transkryptów genów SRTF (rozdział 4.7). Po wprowadzeniu tych restrykcji nie stwierdzono obecności transkryptów dla genu Oct3/4A i innych SRTF w hodowlach MSC pochodzących zarówno ze szpikowych tkanek dorosłych jak i tkanek płodowych izolowanych z galarety Whartona i rosnących w standardowych warunkach atmosferycznego stężenia tlenu.

6.3. Ocena potencjału neurogennego otrzymanych populacji komórek mezenchymalnych pochodzących z tkanki płodowej oraz dorosłej

Jak już wspomniano wcześniej, komórki MSC są zdolne do różnicowania w kierunku komórek tkanki kostnej, chrzęstnej i tłuszczowej. W przypadku tych różnicowań typowych dla mezodermy nie odnotowano różnic pomiędzy komórkami MSC wyizolowanymi z tkanek dorosłych i płodowych. Istnieją jednak doniesienia sugerujące wybiórcze tkankowo specyficzne zdolności do różnicowania komórek MSC (Im i wsp., 2005). Dodatkowo dane literaturowe donoszą o bezpośredniej korelacji między różnicowaniem komórek MSC a wiekiem dawców (Choudhery i wsp., 2014). Oprócz tych dobrze przeanalizowanych kierunków różnicowania istnieje szereg doniesień sugerujących właściwości pluripotencjale komórek MSC pozwalające na różnicowanie przekraczające granice poszczególnych listków zarodkowych prowadzące do neuroektodermalnych komórek nerwowych oraz endodermalnego pochodzenia komórek mięśnia sercowego, wątroby oraz śródbłonna naczyń (Wu i wsp., 2012). Aktualne dane literaturowe uwidaczniają rozbieżności w kwestii posiadania potencjału neuralnego przez komórki MSC i dalszego ich różnicowania w funkcjonalne komórki glejowe lub neurony. Niektórzy badacze uważają, że nawet końcowo zróżnicowane komórki mogą być zdolne do tzw. „transdyferencjacji” czyli zdolności do „prze-różnicowania” pomiędzy różnymi listkami zarodkowymi (Ullah i wsp., 2013). Wcześniej przeważał pogląd głoszący nabywanie cech neuralnych przez MSC w wyniku fuzji z innymi zróżnicowanymi komórkami o fenotypach neuralnych (Weimann i wsp., 2003). Ta nie potwierdzona ciągle hipoteza ma swoich przeciwników domagających się dalszej dokładniejszej weryfikacji (Wislet-Gendebien i wsp., 2005, 2012). Istnieje również, o czym wspomniano we wstępie, hipoteza wyjaśniająca proneuralne różnicowanie MSC neuroektodermalnym pochodzeniem rozwojowym niektórych z subpopulacji komórek. Ogólnie zostało zaakceptowane, że większość mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzi z mezodermy (Miller i wsp., 2007), jednak pierwsza ich kohorta w trakcie rozwoju może wywodzić się z komórek macierzystych grzebienia nerwowego-NCSC (Takashima i wsp., 2007). Wykazano obecność takich subpopulacji komórek MSC o cechach różnicowania przekraczającego granicę mezodermalnego listka zarodkowego w materiale pozyskiwanym z różnych tkanek: w szpiku kostnym, tkance tłuszczowej oraz tkankach płodowych. Wydaje się jednak, że stanowią one stosunkowo nieliczne subpopulacje w dojrzałych MSC, które jest bardzo ciężko otrzymać i scharakteryzować *in vitro*. Obserwuje się drastyczny spadek liczby komórek tej subpopulacji wraz z wiekiem (Wislet-Gendebien S. i wsp., 2012). Ostatnio, w badaniach na myszach, zaproponowano szereg markerów charakteryzujących komórki progenitorowe NCSC o pochodzeniu neuroektodermalnym: pax6, notch1, PCNA, Sox1, Sox3, Sox17, Twist, p75^{NTR},

Snail, Sox9 oraz nestynę (Takashima i wsp., 2007; Morikawa i wsp., 2009; Wislet-Gendebien i wsp., 2012). Nie są to jednak markery wybiórczo specyficzne tylko dla populacji NCSC. W badanych przez nas populacjach komórek w obrazie immunocytochemicznym MSC pochodzących ze szpiku kostnego odnotowano dużo mniejszą liczbę komórek nestynopozytywnych w porównaniu z komórkami MSC pochodzącymi z galarety Whartona. Ponadto tylko MSC z galarety Whartona wykazywały zwiększoną ekspresję niektórych postulowanych markerów neuroektodermalnych tj: p75^{NTR}, SSEA-4, α SMA, a w dalszych pasażach spontanicznie nabywały ekspresji kolejnych markerów charakterystycznych dla wyżej zróżnicowanych komórek neuralnych. Na podstawie oceny zmian profilu ekspresji wybranych genów i białek potwierdzono w komórkach WJ-MSK stopniowe pojawianie się neurofilamentu NF200 oraz białka włókienkowego GFAP. Wyniki tej części badań własnych pokrywały się z obserwacjami innych autorów, którzy w różnie skonfigurowanych protokołach wykazali pozytywne efekty różnicowania neuralnego w hodowlach mezenchymalnych komórek macierzystych (tabela 1, rozdział 1.3.3). Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że w uzyskanym przez nas materiale jedynie w komórkach WJ-MSK udało się zidentyfikować populację o samoistnym potencjale neuroektodermalnym. Szpik kostny nie wykazywał tej właściwości, jednak w przeprowadzonych badaniach nie braliśmy pod uwagę wieku dawcy, co wg danych literaturowych mogło mieć zasadnicze znaczenie dla liczebności tej populacji komórek. Dużo niższa ekspresja Nestyny w stosunku do komórek WJ-MSK w komórkach wyizolowanych ze szpiku kostnego zanikała w dalszych pasażach i korelowała dobrze z zaobserwowanym brakiem innych markerów neuralnych.

Najbardziej kontrowersyjnym wynikiem w naszych badaniach podczas spontanicznej indukcji neuralnej była wysoka, ok 100% ekspresja białka β -tubuliny III występująca w obydwu analizowanych populacjach komórek MSC, niezależnie od współwystępowania lub braku innych markerów neuralnych. Według większości danych literaturowych β -tubulina III uznawana jest za specyficzny marker wczesnych komórek neuronalnych (Fanarraga i wsp., 1999). Poziom ekspresji genu β -tubuliny III w badanych przez nas komórkach MSC był jednak niewspółmiernie wysoki i porównywalny z ekspresją genu referencyjnego. W ostatnich publikacjach zastosowanie β -tubuliny III jako specyficznego markera neuralnego zaczyna być ostro krytykowane. Wyniki pracy Foudah na temat spontanicznej indukcji β -tubuliny III w komórkach MSC sugerują, że wysoka ekspresja tego białka może być wspólną cechą wszystkich rodzajów komórek, pojawiającą się *in vitro* w zależności od warunków hodowli i towarzyszących zmian fenotypowych powiązanych ze zmianami zachodzącymi w cytoszkielecie. Ponadto badacze postulują zachowanie szczególnej ostrożności w interpretowaniu wyników opartych jedynie na ekspresji pojedynczego białka o domniemanym charakterze neuralnym (Foudah i wsp., 2014). W kolejnej pracy tej samej grupy autorów zidentyfikowano obecność β -tubuliny III w komórkach MSC poddanych różnicowaniu w

kierunku adipocytów i osteocytów (Foudah i wsp., 2013). Z naszych obserwacji wynika, że ekspresja β -tubuliny III pojawia się na etapie 2-3 pasażu w obydwu typach, WJ i BM badanych komórek MSC i utrzymuje się na stałym poziomie w trakcie dalszej hodowli. Ostatnio okazało się również, że niektóre komórki pochodzenia nie-neuralnego mogą wykazywać *in vitro* wysoki poziom ekspresji białka β -tubuliny III. Uzyskany wynik badacze tłumaczyli zaburzeniem ekspresji białek włóknkowych, związanych z adherencją i stopniowym zwiększaniem powierzchni przylegania komórek hodowanych. Postulowany był również udział β -tubuliny III w procesie transformacji nowotworowej (Katsetos i wsp., 2003).

6.4. Analiza porównawcza reakcji obu badanych typów komórek MSC na obniżone warunki stężenia tlenu w hodowli

Hodowla *in vitro* ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych w terapii komórkowej prowadzona jest standardowo w warunkach atmosferycznego 21% parcjalego stężenia O_2 . Warunki te określane są mianem „normoksji” pomimo, że pomiary stężenia tlenu w tkankach prawidłowych zawierających nisze komórek macierzystych, mieszczą się w o wiele niższym zakresie stężeń 2%-9% (Mohyeldin i wsp. 2010, tabela 3, rozdział 1.6). Uważa się, że *in vivo* stężenie tlenu jest uzależnione od unaczynienia tkanki i jej aktywności metabolicznej. Mierząc średnie stężenie O_2 w tkankach stwierdzono poziomy pomiędzy 1% a 7% dla komórek ze szpiku i mózgu oraz nieco wyższe, w przedziale od 10% do 15% tlenu, dla tkanki tłuszczowej (Ward i wsp., 2008). Hodowle komórek MSC prowadzone w zróżnicowanych warunkach tlenowych wykazały, że w stężeniach tlenu odpowiadających tzw. „normoksji” czyli około 21% O_2 , komórki znajdują się w ciągłym stanie tzw. hiperoksji. MSC fizjologicznie zasiedlające nisze komórkowe o niskim stężeniu tlenu w wyniku ekspozycji na 21% stężenie tlenu podczas hodowli *in vitro* są narażone na stres oksydacyjny i toksyczny wpływ wolnych rodników, co w dalszej konsekwencji może prowadzić do szybszego starzenia się komórek ze wszystkimi konsekwencjami metabolicznymi tego procesu (Basciano i wsp., 2011).

Według danych literaturowych obniżone stężenie (3-10%) tlenu jest istotnym parametrem, który wywiera korzystny wpływ na wydajność ekspansji komórek MSC w warunkach hodowli *in vitro*. Aktualnie proponuje się wręcz używanie terminu „fizjoksja” dla określeń stężeń parcjalnych O_2 , które odpowiadają warunkom panującym fizjologicznie w określonej tkance (Carreau i wsp., 2011). W wielu niezależnych pracach obserwowano zwiększenie tempa podziałów oraz zatrzymanie procesów związanych ze starzeniem i śmiercią w hodowli komórkowej w warunkach tlenowych odpowiadających limitom stężenia fizjologicznego. Uważa się, że dopiero prowadzenie hodowli w obniżonych stężeniach tlenu utrzymuje fizjologiczny stan metaboliczny w komórkach hodowlanych. Zaobserwowano

również, że wcześniejsza, czasowa ekspozycja MSC na hipoksję (prekondycjonowanie) zwiększa wyraźnie ich zdolności regeneracyjne i czas przeżycia po przeszczepie (Rosova i wsp., 2008).

Podsumowując wyniki tej części rozprawy, która przedstawia reakcje obu typów komórek mezenchymalnych, WJ-MSC i BM-MSC, na obniżenie stężenia tlenu w hodowli należy stwierdzić, że jest ona wyraźnie zróżnicowana zarówno pod względem jakościowym jak i ilościowym. Komórki WJ-MSC_{NT} zwiększają swoją proliferację znacznie bardziej niż BM-MSC_{NT}, co ma odbicie w obniżeniu się średniego czasu podwajania populacji (ryc. 39 przedstawia wyniki zbiorcze dla grup MSC w stosunku do atmosferycznych warunków). Również zwiększona proliferacja w hodowlach WJ-MSC_{NT} utrzymuje się znacząco dłużej (aż do 11-go pasażu), kiedy to komórki BM-MSC_{NT} zwalniają podziały i wykazują cechy starzenia już powyżej 5-go pasażu. Można wyróżnić 2 składowe obserwowanego efektu, a mianowicie działanie bezpośrednie na szybkość podziałów komórkowych ale również bezpośredni wpływ obniżonego stężenia tlenu na żywotność i przeżycie komórek w tych bardziej fizjologicznych warunkach hodowli. Dodatkowym potwierdzeniem różnic w reakcji badanych typów komórek MSC na ekspozycję 5% tlenu jest wynik immunodetekcji białka Ki-67 - typowego markera podziałów komórkowych. Pozytywny wynik reakcji immunocytochemicznej wykazał wzrost ekspresji Ki-67 w obu typach komórek MSC pod wpływem obniżonego stężenia tlenu, jednak dla WJ-MSC rosnący z 39,82% w warunkach standardowych do 63,14% w warunkach 5% stężenia tlenu oraz wyraźnie niższy i zmieniający się odpowiednio z 15,98% do 25,17% dla BM-MSC. Na tej podstawie, wykazano, że ilość komórek znajdujących się w cyklu podziałowym wykazuje poziom proporcjonalny do oceny całościowej szybkości proliferacji bazującej na przyroście wszystkich komórek znajdujących się w hodowli.

	Średnie PDT 1-5 pasaż (dni)	Średnie PDT 6-10 pasaż (dni)
WJ-MSC _{AT}	2,53	5,81
WJ-MSC _{NT}	1,92	2,3
BM-MSC _{AT}	6,87	12,09
BM-MSC _{NT}	4,50	8,43

Ryc. 39. Porównanie czasu podwajania populacji komórek WJ-MSC i BM-MSC w wyniku reakcji na warunki obniżonego stężenia tlenu. Średni czas podwajania populacji PDT we wczesnych (1-5) oraz późniejszych (6-10) pasażach.

Metabolizm komórek MSC może być też uzależniony od rodzaju niszy, z której pierwotnie pochodzą, co po części tłumaczy inną reakcję proliferacyjną badanych komórek

MSC otrzymywanych z dwóch różnych źródeł. Powszechnie przyjmuje się, że odpowiedź adaptacyjna komórek na zmniejszone stężenie tlenu polega przede wszystkim na aktywacji sygnału indukowanego przez zwiększoną ekspresję czynników HIF (Semenza i wsp., 2006). Ponadto uważa się, że jest to jeden z kluczowych mechanizmów regulujących aktywność wielu czynników transkrypcyjnych zasadniczych dla utrzymania pluripotencji w liniach ESC i iPS-ów *in vitro* (Covello i wsp., 2006; Forristal i wsp., 2010).

W naszych badaniach podjęliśmy próbę korelacji obserwowanej indukcji czynników HIF, zwiększonej proliferacji i odróżnicowania komórek WJ-MSC_{NT} z generacją epigenetycznego sygnału deacetylacji histonów blokowanej przez TSA.

Stwierdziliśmy, że stymulacja proliferacji komórek MSC pod wpływem obniżonego do 5% stężenia tlenu występuje wyłącznie w powiązaniu z indukowaną przez hipoksję nadekspresją genów HIF-1 α i 2 α . Co szczególnie interesujące, obie te reakcje korelowały z indukcją genów pluripotencjalności i z zanikiem ekspresji białek i genów charakterystycznych dla nabytego zróżnicowania proneuralnego komórek WJ-MSC. W efekcie komórki zmieniały swój fenotyp w kierunku bardziej odróżnicowanym z jednoczesnym zanikiem markerów neuralnych (NF200, GFAP) i pojawieniem się pełnego zestawu genów SRTF (Oct3/4, Sox2, Rex, Nanog).

Wszystkie opisane powyżej reakcje komórek WJ-MSC na obniżone stężenie tlenu wykazały ścisły związek korelacyjny z nadekspresją genów czynników HIF-1 α /HIF-2 α . Zahamowanie indukcji genów HIF przez potraktowanie komórek WJ-MSC_{NT} niecytotoksycznymi stężeniami uznanego modyfikatora acetylacji histonów, TSA (Trichostatyną A) i współistnienie ze zniesieniem odpowiedzi proliferacyjnej komórek na hipoksję, pozwala postulować istnienie związków przyczynowo-skutkowych pomiędzy tymi reakcjami, a poziomem acetylacji białek histonowych.

Jednocześnie wykazano, że hodowla WJ-MSC_{NT} w warunkach obniżonego stężenia tlenu, pomimo przyspieszonego tempa proliferacji z cechami odróżnicowania fenotypowego, nie wpływała znacząco na zmianę kariotypu komórek w czasie długotrwałego pasażowania, wskazując na zachowanie stabilności genomu w tych warunkach. Jest to jedynie wstępna lecz istotna obserwacja z punktu widzenia możliwości praktycznego zastosowania terapeutycznego komórek MSC_{NT} hodowanych w obniżonym stężeniu tlenu. Jednak w przyszłości wprowadzenie tych komórek do terapii wymagać będzie rozszerzenia badań o dodatkowe testy bezpieczeństwa w oparciu o ostatnio wprowadzone przepisy międzynarodowe (Drela i wsp., 2013). W naszych badaniach wykazaliśmy, że hodowle ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych w niższych stężeniach (5%) tlenu znacznie zwiększają proliferację i długowieczność komórek, co jest bardzo istotne z punktu widzenia praktycznego. Dodatkowo wykazano, że jedynie w komórkach typu płodowego (WJ-MSC_{NT}) następuje w tych warunkach stymulacja tworzenia się CFU wskazując dodatkowo,

poza ekspresją genów SRTF, na indukcję macierzystości w tych hodowlach. Wiele danych z literatury potwierdza pośrednio nasze obserwacje, a badacze polecają środowisko obniżonego tlenu jako bardziej optymalne i zbliżone do występującego fizjologicznie w niszy komórek macierzystych czy też w mózgu (tabela 3 rozdział 1.6), jednak możliwości jego zastosowania do hodowli bezpiecznych klinicznie komórek MSC nie zostały jeszcze w pełni zweryfikowane.

6.5. Indukowane różnicowanie neuralne WJ-MSC (mezenchymalnych komórkach macierzystych z galarety Whartona) hodowanych w obniżonym stężeniu tlenu

W prowadzonych badaniach wykazano, że komórki WJ-MSC hodowane w niskim stężeniu tlenu tracą swój potencjał do spontanicznego różnicowania proneuralnego. Powstało więc pytanie czy jest to cecha stała czy też możliwa jest taka modyfikacja środowiskowo/epigenetyczna, która umożliwi dalszą indukcję różnicowania do pożądanego fenotypu neuronalnego komórek hodowanych w 5% O₂. Różnicowanie komórek macierzystych podlega kontroli ze strony zarówno mechanizmów genetycznych, jak i epigenetycznych. Zmiany we wzorze epigenotypu, wpływając na modyfikację DNA czy histonów, mogą prowadzić do aktywacji/inhibicji wielu genów zaangażowanych w regulację procesu różnicowania. Z tego względu dokładne poznanie tych procesów może mieć istotne znaczenie dla ich praktycznego zastosowania w sterowaniu procesami korzystnymi dla terapii komórkowej. W trakcie prowadzonych badań podjęto próbę zwiększenia plastyczności różnicowania mezenchymalnych komórek macierzystych hodowanych w niskim stężeniu tlenu poprzez zastosowanie m.in. znanego modyfikatora epigenetycznego Trichostatyny A (TSA). Ostatnio coraz powszechniejszy jest pogląd, że hamowanie aktywności HDAC przez ten związek umożliwia aktywującą acetylację białek histonowych w odcinkach promotorowych genów związanych z różnicowaniem komórek. Zahamowanie deacetylazy histonowej (HDAC) powoduje wzrost poziomu acetylacji grup aminowych reszt lizynowych histonów. To z kolei prowadzi do rozluźnienia oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy białkowym rdzeniem histonowym i DNA, ułatwiając dostęp kompleksu transkrypcyjnego do wielu pierwotnie nieaktywnych genów.

Zastosowanie TSA w przypadku mezenchymalnych komórek macierzystych hodowanych w warunkach 5% tlenu spowodowało, poza istotnym zahamowaniem ich proliferacji (Dyskusja w rozdziale 5.4.), uwrażliwienie WJ-MSC na indukcję zróżnicowania neuronalnego. Klasyczne związki, stymulujące różnicowanie progenitorów w kierunku neuralnym przedstawione w tabeli 4 w rozdziale 4.5, okazały się mało efektywne w przypadku WJ-MSC hodowanych w niskim tleniu. Jedynie wcześniejsza krótkotrwała (24-48 godz.) preinkubacja z TSA (tzw. „priming”) powodowała, że pod wpływem klasycznych neuromorfenów (dbcAMP,

RA, BDNF) komórki te nabrały cech morfologicznych charakterystycznych dla komórek neuralnych i wykazywały obecność białka markerowego dla zróżnicowanych neuronów, MAP2. Komórki te wytwarzały również charakterystyczną wielowypustkową sieć o morfologicznych cechach neuronalnych. W przypadku braku preinkubacji z TSA, komórki te były niewrażliwe na działanie morfogenów, zachowując swój pierwotny, mezenchymalny fenotyp.

Otrzymane przeze mnie wyniki sugerują, że inhibitory HDAC, powodując niespecyficzny wzrost acetylacji białek histonowych w promotorowych odcinkach niektórych genów związanych z różnicowaniem, mogą odblokowywać ich reaktywność na różnicujące czynniki transkrypcyjne oraz zwiększając plastyczność komórek, umożliwiać ich dalsze różnicowanie w kierunku neuralnym.

6.6. Parakryne funkcje komórek MSC i możliwość wykorzystania czynników neurotroficznych w terapii schorzeń neurodegeneracyjnych

Kolejną kluczową cechą MSC z klinicznego punktu widzenia są ich zdolności do produkcji licznych czynników wzrostowych, cytokin i chemokin (Caplan i wsp., 2006). Badania wielu autorów dowiodły, że przeszczep mezenchymalnych komórek macierzystych u zwierząt w uszkodzeniach ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego korzystnie wpływa na poprawę funkcji. Mimo stosunkowo krótkiego czasu przeżycia podanych komórek w organizmie biorcy obserwowano znaczną poprawę procesów regeneracyjnych. Mechanizm pozytywnego działania egzogennych komórek po ich przeszczepie nie został jednak szczegółowo wyjaśniony. Komórki macierzyste/progenitorowe, w tym mezenchymalne izolowane z różnych źródeł uwalniają szereg substancji, wśród nich: NGF, BDNF, GDNF, FGF-2, VEGF, HGF, CNTF (Chen i wsp., 2008; Caplan i wsp., 2006;; Machalińska i wsp., 2015; Maltman i wsp., 2011; Paczkowska i wsp., 2013). To pozwala przypuszczać, iż MSC po przeszczepieniu do mózgu lub rdzenia kręgowego modyfikują mikrośrodowisko tkanki nerwowej poprzez uwolnione czynniki troficzne. Do najczęściej badanych czynników wzrostu w eksperymentalnych modelach na zwierzętach należą: BDNF, GDNF, VEGF, NT3, NT4, NGF. Szereg artykułów przeglądowych zawiera informacje dotyczące znaczenia tych czynników w sterowaniu procesami neurogenezy po uszkodzeniu (Kelamangalath i wsp., 2013). BDNF jest jednym z najbardziej obiecujących czynników wzrostu w terapii regeneracyjnej dla komórek nerwowych, który reguluje wiele funkcji w tym przeżycie, neurogenezę oraz plastyczność połączeń neuronów. Neuroprotektynne działanie BDNF po urazie zostało udokumentowane w badaniach na szczurach, w których wykazano zależną od BDNF proliferację oligodendrocytów i mielinizację regenerujących aksonów (Chen i wsp.,

2013). Z badań *in vitro* wynika, że komórki jednojądrzaste krwi pępowinowej mają większą zdolność do syntezy czynników neurotroficznycych w tym: BDNF, GDNF oraz NT4 (Fan i wsp., 2005, Paczkowska i wsp., 2013) w porównaniu do komórek izolowanych z krwi obwodowej. W badaniach własnych wykazaliśmy prawie 4 krotnie wyższy poziom ekspresji genu dla BDNF w komórkach MSC z galarety Whartona w porównaniu do komórek MSC ze szpiku. Co ciekawe nie odnotowano ekspresji genu kodującego receptor dla BDNF, TrkB w obydwu badanych rodzajach MSC.

Kolejnymi neurotrofinami, których ekspresję wykazano na poziomie mRNA były NT3, NT4, NGF. Dwie pierwsze badane neurotrofiny wykazywały stosunkowo wyższy poziom ekspresji w komórkach izolowanych z tkanki niedojrzałej. Natomiast ekspresja genu NGF była wyższa w komórkach MSC wyizolowanych ze szpiku. W przypadku tych trzech czynników neurotroficznycych również nie zaobserwowano ekspresji specyficznych dla nich receptorów, jedynie w niektórych próbach za pomocą metody Real-time PCR stwierdzono śladowy poziom mRNA w komórkach pochodzących z izolacji ze szpiku kostnego. Zaobserwowany wynik ekspresji graniczył z poziomem tła i można uznać go jako mało informatywny. Aktywacja funkcji receptorów w komórkach mogących odpowiadać na określony czynnik jest procesem skomplikowanym i wieloetapowym. Obecność białkowej formy danego receptora nie zawsze koreluje z ekspresją mRNA. Aby określić aktywność badanych receptorów dla neurotrofin potrzebne byłoby przeprowadzenia dodatkowych badań na poziomie białka i po indukcji specyficznym ligandem. Istnieją sprzeczne dane na temat funkcji receptorów neurotrofin w komórkach nieneuralnych. Uważa się, że nadekspresja receptora TrkB w niektórych z nich może ułatwiać powstawanie przerzutów poprzez indukcję przejścia mezenchymalno-epitelialnego (Sinkevicius i wsp., 2014). W naszych badaniach zaobserwowano natomiast ekspresję niespecyficznego receptora neurotrofin o niższym powinowactwie, p75^{NTR} uważanego za specyficzny dla populacji mało zróżnicowanych komórek progenitorowych.

Wielu autorów podkreśla również istotną rolę w stymulacji procesów naprawczych czynnika wzrostu śródbłonna naczyń VEGF (Eming i wsp., 2006; Silva i wsp., 2010). W badanych przez nas populacjach komórek MSC poziom transkryptów genu VEGF był zauważalnie (8 krotnie) wyższy w komórkach wyizolowanych z galarety Whartona. Czynnikiemami wzrostowymi, które ulegały podobnej ekspresji w obydwu populacjach komórek MSC były EGF, IGF oraz CNTF, występujące jednak na zdecydowanie niższym poziomie. Podsumowując otrzymane wyniki należy potwierdzić parakrynną funkcję badanych komórek MSC z wyższą tendencją WJ-MSK do produkcji szeregu neurotrofin (NT3, NT4, BDNF) oraz czynników wzrostowych (VEGF, HGF). Wydaje się jednak, że poziomy ekspresji tych genów mogą być zmienne w zależności od wielu czynników środowiskowych, a tym samym obie badane populacje MSC mogą stanowić cenne źródło czynników wzrostowych i neurotroficznycych do zastosowania w terapii regeneracyjnej.

6.7. Implikacje kliniczne przeprowadzonych badań

Brak skutecznego leczenia następstw schorzeń neurologicznych skłania do poszukiwania nowych metod terapii. Koncepcja klinicznego zastosowania MSC wydaje się być wielką nadzieją w leczeniu chorób neurologicznych zarówno tych o charakterze neurodegeneracyjnym, jak i w innych uszkodzeniach ośrodkowego układu nerwowego powstałych w wyniku udaru czy urazu. Wydaje się, że mezenchymalne komórki macierzyste mogą mieć zastosowanie nie tylko ze względu na swoje funkcje immunomodulacyjne i przeciwzapalne wykorzystywane już szeroko w klinice, lecz również ze względu na swój potencjał neurogeny do bezpośredniej regeneracji i repopulacji struktur układu nerwowego. Wyniki badań pierwszej dekady naszego wieku ujawniły *in vitro* i *in vivo* możliwość otrzymania funkcjonalnych komórek macierzystych różnicujących się pro-neuralnie z różnych tkanek płodowych i okołoporodowych (Bużańska i wsp., 2002, 2006). Jednak otrzymanie wystarczająco dużych ilości bezpiecznych biologicznie, nieimmunogennych, terapeutycznych komórek macierzystych stanowi jedno z najpoważniejszych i wciąż aktualnych wyzwań praktycznych medycyny regeneracyjnej. Wyniki uzyskane podczas moich badań wskazują, że zbędna tkanka pozostająca po porodzie, którą jest m.in. galareta Whartona sznura pępowinowego, może posłużyć do opracowania nowych, skutecznych i wydajnych metod pozyskiwania neurologicznie ukierunkowanych, potencjalnie terapeutycznych komórek macierzystych do użytku klinicznego. Jedną z takich wielce obiecujących modyfikacji fenotypu komórek *in vitro* jest scharakteryzowana w tej rozprawie hodowla prowadzona w warunkach obniżonego stężenia parcjalnego tlenu tzw. fizjoksji (Carreau i wsp., 2011).

Przeprowadzona analiza porównawcza biorąca pod uwagę obserwacje własne jak i aktualną literaturę przedmiotu wykazała, że badane populacje dorosłych i płodowych komórek MSC nie są w pełni równoważne z punktu widzenia możliwości ich zastosowania terapeutycznego, z wyraźną przewagą tych ostatnich w promowaniu regeneracji OUN. Poznanie mechanizmów kontrolujących plastyczny fenotyp macierzystych komórek mezenchymalnych hodowanych w fizjologicznych warunkach tlenowych (fizjoksji) *in vitro*, może być decydującym elementem w przełamaniu istniejących barier i trudności w ekspansji, zasiedlaniu, różnicowaniu i aktywnym współdziałaniu egzogennych komórek naprawczych w leczeniu dysfunkcji i uszkodzeń strukturalnych układu nerwowego.

7. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

1. Ustalono metody izolacji oraz warunki i wydajność hodowli mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego, galarety Whartona oraz krwi pępowinowej zgodnie z wymogami stawianymi przez ISSC. Najbardziej wydajnym źródłem MSC okazała się galareta Whartona sznura pępowinowego, natomiast krew pępowinowa wykazała jedynie znikomą zawartością trudnych do izolacji komórek mezenchymalnych i w związku z tym została wykluczona jako małoefektywna z dalszych badań.
2. Jedynie komórki pochodzące z galarety Whartona (WJ-MSC) w standardowych warunkach hodowli różnicowały się spontanicznie w kierunku pro-neuralnym, przyjmując typowe dla tego procesu cechy fenotypowe ze zwiększoną ekspresją markerów liniowych: nestyny, GFAP, NF200.
3. Te same komórki po miesięcznej ekspozycji na niskie (5%) stężenie tlenu ulegały stopniowemu odróżnicowaniu z towarzyszącym zanikiem cech neuralnych i nabywaniem fenotypu zarodkowego oraz ekspresją typowych dla pluripotencjalności markerów SRTF (Oct3/4, Sox2, Rex, Nanog).
4. Reakcji komórek WJ-MSC na obniżone stężenie tlenu towarzyszyła indukcja genów podjednostki alfa czynnika HIF-1 i HIF-2, przy czym indukcja HIF-2 była statystycznie istotna.
5. Komórki MSC izolowane z obu badanych źródeł: szpiku i sznura pępowinowego, reagowały jakościowo podobnie na warunki hodowli w obniżonych stężeniach tlenu w aspekcie zwiększonego tempa podziałów komórkowych, zahamowania objawów starzenia i wydłużenia czasu trwania hodowli bez towarzyszących zmian kariotypu.
6. Wykazano blokujący wpływ trichostatyny, związku hamującego aktywność HDAC i zwiększającego poziom acetylacji histonów, na triadę reakcji wywołanych obniżeniem stężenia tlenu w hodowli WJ-MSC_{NT}: (i) indukcję czynników HIF, (ii) wzmożoną proliferację i (iii) zahamowanie zróżnicowania pro-neuralnego komórek. Może to sugerować powiązanie przyczynowo-skutkowe obserwowanych efektów ze zmianami epigenetycznymi acetylacji histonów wywołanymi przez TSA.
7. Komórki WJ-MSC_{NT} jedynie po wstępnej ekspozycji na TSA reagowały pozytywnie na klasyczne induktory różnicowania neuralnego: cAMP, BDNF, RA, wytwarzając sieć o

morfologicznych cechach neuronalnych utworzoną z komórek wykazujących ekspresję MAP2, markera dojrzałych neuronów.

8. Wyższy, w porównaniu do BM-MSC, potencjał komórek z WJ-MSC do różnicowania w kierunku neuralnym korelował pozytywnie ze zwiększoną transkrypcją genów dla panelu czynników neurotroficznych, a w szczególności dla BDNF, GDNF, VEGF, HGF, NT3 i NT4.

Wnioski:

1. Badania porównawcze komórek MSC izolowanych z różnych źródeł tkankowych, których wyniki zostały przedstawione powyżej, wskazują wyraźnie na wyjątkową przydatność hodowli WJ-MSC do terapii komórkowej chorób układu nerwowego.
2. Hodowle MSC prowadzone w warunkach obniżonego stężenia tlenu będącego odpowiednikiem warunków fizjologicznych panujących w niszy komórek macierzystych, wpływają korzystnie na proliferację, przeżywalność i różnicowanie komórek progenitorowych.

8. STRESZCZENIE

Mezenchymalne komórki macierzyste (MSC) pochodzące z organizmów dojrzałych to komórki stosunkowo łatwe do wyizolowania i utrzymania w warunkach hodowli *in vitro*. MSC mają duże zdolności plastyczne, mogą różnicować się do komórek tkanki chrzęstnej, kostnej oraz tłuszczowej. Ostatnie doniesienia sugerują również zdolność tych komórek do nietypowego różnicowania się w komórki innych niż mezodermalne listków zarodkowych np. do pochodzących z ektodermy neuronów. Komórki MSC można znaleźć w szpiku kostnym, a także w wielu innych tkankach i narządach. Podejmowane są również próby wykorzystania tkanek pozostałych po porodzie tzw. tkanek popłodu wliczając w to galarety Whartona oraz krew pępowinową. Terapia mezenchymalnymi komórkami macierzystymi budzi ogromne nadzieje dla zastosowania ich w medycynie regeneracyjnej. W badaniach na zwierzętach udokumentowano terapeutyczne działanie komórek MSC w modelach wielu chorób. Oprócz ich ogólnoustrojowego działania związanego z wydzielaniem biologicznie ważnych czynników wpływających korzystnie na endogenne procesy naprawcze, przeszczepione MSC mogą wykazywać potencjał do zastępowania uszkodzonych tkanek i komórek.

W przedstawionej rozprawie podjęto próbę opracowania wydajnej metody izolacji a następnie hodowli mezenchymalnych komórek macierzystych otrzymywanych z tkanek niedojrzałych (galarety Whartona sznura pępowinowego oraz krwi pępowinowej) i tkanek dorosłych (szpiku kostnego). W toku realizacji pracy ustalono parametry dla hodowli tych rodzajów MSC, określano stan ich zróżnicowania i właściwości plastyczne a następnie analizowano zdolności do różnicowania neuralnego.

Charakterystyka otrzymanych populacji komórek obejmowała ich ocenę pod kątem obecności specyficznych markerów mezenchymalnych oraz potencjału do różnicowania w komórki mezodermy. Z dwóch analizowanych źródeł udało się uzyskać homogenną frakcję komórek MSC (WJ-MSC, BM-MSC), co zostało potwierdzone pozytywną ekspresją markerów typowych dla MSC zatwierdzonych przez Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej. Zastosowana charakterystyka oceny fenotypu mezenchymalnego nie wykazała różnic pomiędzy analizowanymi frakcjami pochodzącymi ze szpiku kostnego oraz galarety Whartona. Natomiast uzyskana populacja komórek MSC z krwi pępowinowej okazała się stosunkowo nieliczna i trudna do izolacji, co spowodowało wykluczenie tego źródła jako materiału do dalszych analiz. Populacja komórek krwi pępowinowej oprócz potwierdzonych badaniami immunocytochemicznymi cech MSC charakteryzowała się obecnością wielu dodatkowych heterogennych frakcji komórek jednojądrzastych (MNC). Podczas dalszej charakterystyki wyizolowana frakcja komórek krwi pępowinowej wykazywała cechy pluripotencjalne potwierdzone obecnością zestawu genów SRTF (Oct3/4, Sox2, Rex1, Nanog). Nasza

obserwacja w pełni pokryła się z danymi literaturowymi, w których autorzy zwracają uwagę na trudności w otrzymywaniu czystej populacji tych komórek MSC i sugerują wykorzystanie do transplantacji całej frakcji komórek MNC krwi pępowinowej.

Z niektórych danych literaturowych wynika, że MSC pochodzące z tkanek płodu, w tym krwi pępowinowej i galarety Whartona, są dzięki swojej niedojrzałości rozwojowej bardziej pierwotne i o szerszych możliwościach do wielokierunkowego różnicowania w porównaniu z tymi izolowanymi z tkanek dorosłych organizmów. W naszych badaniach zaobserwowaliśmy, że komórki wyizolowane z galarety Whartona wykazują ekspresję markera wczesnej mezodermy Brachyury. Kolejną cechą, potwierdzającą mniej zróżnicowany charakter komórek WJ-MSC, była zaobserwowana na wczesnych etapach hodowli wyższa ekspresja antygenu SSEA-4 uważanego za marker pluripotentnych komórek niezróżnicowanych. Komórki pochodzące z tkanki dorosłej ze szpiku kostnego, charakteryzowały się stosunkowo niższą ekspresją tego markera oraz brakiem Brachyury. Inną obserwacją, potwierdzającą mniej zróżnicowany charakter komórek otrzymanych z galarety Whartona, była obecność charakterystycznych skupisk komórek tworzących kolonie zwane również centrami intensywnej proliferacji. Przeciwnie w komórkach ze szpiku nie udało się ich zaobserwować.

W kolejnych etapach prowadzonych badań porównywano otrzymane populacje komórek pod kątem zdolności do różnicowania w kierunku komórek z linii neuralnej. Jest to kluczowe w poszukiwaniu najlepszego źródła do zastosowań potencjalnie terapeutycznych w chorobach neurologicznych, w których obecnie nie ma skutecznych metod leczenia. Otrzymane przez nas wyniki wykazały duże zdolności do różnicowania neuralnego komórek pochodzących z galarety Whartona. W standardowych warunkach hodowli WJ-MSC spontaniczne nabywały ekspresji markerów neuralnych. Na wczesnych etapach hodowli zaobserwowano pojawianie się markera progenitorów neuroektodermalnych Nestyny, a następnie w trakcie kolejnych pasażi neurofilamentu NF-200 oraz kwaśnego białka włóknikowego GFAP. Przeciwnie, frakcja komórek MSC otrzymanych ze szpiku charakteryzowała się tylko pojedynczymi komórkami nestyno-pozytywnymi, które w dalszej hodowli zanikały i nie nabywały kolejnych cech neuralnych. Wyższy, w porównaniu do BM-MS, potencjał komórek z WJ-MS do różnicowania w kierunku neuralnym korelował pozytywnie ze zwiększoną transkrypcją genów dla panelu czynników neurotroficznych, a w szczególności dla BDNF, GDNF, VEGF, HGF, NT3 i NT4.

W dalszych badaniach podjęto próbę oceny wpływu zastosowania warunków obniżonego 5% tlenu na komórki MSC poddane długotrwałej ekspozycji w kontekście indukcji cech pluripotencjalności. Na podstawie danych literaturowych można wywnioskować, że mezenchymalne komórki macierzyste powinny być hodowane w warunkach, które

odzwierciedlają środowisko niszy, z której pierwotnie pochodzą. Odzwierciedlenie naturalnego środowiska niszy może zwiększać proliferację i wpływać pozytywnie na właściwości plastyczne komórek macierzystych. Jak zaprezentowano w badaniach własnych, zastosowane warunki 5% stężenia tlenu w hodowli *in vitro* mezenchymalnych komórek macierzystych było ważnym czynnikiem utrzymującym podziały komórkowe na intensywnym poziomie oraz prowadziło do przedłużenia hodowli obu typów analizowanych komórek. Jednak populacja komórek uzyskanych z tkanki niedojrzałej WJ-MSC wykazywała dużo silniejszą reakcję proliferacyjną na zastosowane warunki obniżenia stężenia tlenu. Ponadto, reakcji komórek WJ-MSC na obniżone stężenie tlenu towarzyszyła indukcja transkrypcji genów podjednostki alfa czynnika HIF-1 i czynnika HIF-2.

W komórkach WJ-MSC w powyższych warunkach oceniano również ekspresję genów charakterystycznych dla komórek pluripotencjalnych oraz genów związanych z różnicowaniem neuralnym. Jedynym ze znaczących wyników odróżniającym hodowlę komórek WJ-MSC z niskiego tlenu okazał się zanik cech neuralnych w tym neurofilamentu NF200 oraz GFAP, który wcześniej komórki spontanicznie nabywały w warunkach atmosferycznej zawartości tlenu. Ponadto, co najbardziej istotne, komórki WJ-MSC ulegały stopniowemu odróżnicowaniu i wykazywały ekspresję typowych dla pluripotencjalności markerów SRTF (Oct3/4, Sox2, Rex1, Nanog). Komórki populacji szpikowej wykazały brak reakcji odróżnicowania w wyniku zastosowania obniżonych warunków tlenu, nie stwierdzono u nich indukcji żadnego z badanych genów pluripotencjalności.

W dalszych badaniach uwaga została skupiona na zagadnieniach związanych z mechanizmami kontrolującymi stan epigenomu w kontekście regulacji ważnych procesów rozwojowych, różnicowania i podziałów komórkowych. Czynnikiem modyfikującym, który zastosowano był inhibitor enzymów katalizujących deacetylację histonów (HDAC) Trichostatyna A (TSA). Trichostatyna A jest silnym, odwracalnym inhibitorem deacetylazy i zapobiega usuwaniu grup acetylowych z reszt lizynowych na histonach. Ostatnio coraz powszechniejszy jest pogląd, że hamowanie aktywności HDAC przez ten związek umożliwia acetylację białek histonowych w odcinkach promotorowych genów związanych z procesem różnicowania komórek macierzystych. W naszych doświadczeniach komórki WJ-MSC_{NT} poddane działaniu inhibitora HDAC, TSA w warunkach hipoksji hamowały proliferację w mechanizmie zależnym od indukowanego hipoksją czynnika HIF α 1 i 2. Modyfikator ten również wykazał wpływ na proces różnicowania neuralnego komórek WJ-MSC. Zaobserwowano, że komórki WJ-MSC_{NT} po potraktowaniu TSA odzyskiwały potencjał różnicowania neuralnego. Z naszych badań wynika, że WJ-MSC_{NT} jedynie po wstępnej ekspozycji na TSA reagowały pozytywnie na klasyczne induktory różnicowania neuralnego: cAMP, BDNF, RA, wytwarzając sieć o morfologicznych cechach neuronalnych, utworzoną z

komórek wykazujących wysoką ekspresję MAP2, markera dojrzałych neuronów. Przeprowadzone badania wskazują na szczególną rolę poziomu acetylacji białek histonowych zależnych od warunków tlenowych w indukcji pluripotencjalności i w procesie różnicowania w kierunku fenotypów neuralnych mezenchymalnych komórek macierzystych. Badanie zachowania mezenchymalnych komórek macierzystych w hodowli *in vitro* mogą dostarczyć istotnych informacji na temat ich potencjalnych zdolności regeneracyjnych oraz reakcji na poszczególne cząsteczki sygnałowe, kierujące procesem związanym z różnicowaniem neuralnym. Poznanie wpływu różnych czynników na zachowanie komórek mezenchymalnych może pozwolić na ich precyzyjną manipulację i wybór najlepszego źródła komórek w celu wykorzystania w terapii schorzeń układu nerwowego. Nasze badania wykazały ogromną plastyczność komórek otrzymanych z galarety Whartona oraz możliwość uzyskania z nich komórek o zróżnicowanych fenotypach neuralnych, predestynując ten typ mezenchymalnych komórek macierzystych do zastosowań neurologicznych. Komórki z galarety Whartona stanowiły również korzystniejsze źródło do terapii ze względu na stosunkowo większy neurotroficzny efekt parakryny. Wnioski wypływające z przeprowadzonych badań wskazują na wyjątkową przydatność hodowli WJ-MSC pochodzącej z tkanki o cechach płodowych do terapii komórkowej chorób układu nerwowego.

9. ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) exert unique ability to differentiate into various cells of mesodermal origin. These properties place MSC as a very promising source of cells for regenerative medicine and tissue engineering. Recently, it has been shown that experimental transplantation of MSC improves a variety of neurological dysfunctions. Bone marrow (BM) represents the most exploited source of human therapeutic stem cells. However, similar populations have been recently identified in many other tissues. Among them, umbilical cord Wharton jelly and umbilical cord blood have been recognized for their safety, accessibility and differentiation potential. This study compares MSC derived from different type of tissues: (i) neonatal human Wharton Jelly-derived MSC (WJ-MSC), (ii) neonatal human Umbilical-Cord-Blood (UBC-MSC) and (iii) adult human Bone Marrow (BM-MSC) in terms of cell phenotypes, optimal growth and multilineage differentiation characteristics with special attention to neurogenic potential. We have demonstrated that, both isolated WJ-MSC and BM-MSC, exhibited phenotypes specific for mesenchymal cell by expressing surface antigens (CD73, CD90, CD105, CD166) as well as typical for MSC multilineage differentiation abilities. However, efficiency of these processes differs markedly between the cells derived from each of examined tissues. On the basis of this study we can conclude that the best source to obtain MSCs was human Wharton jelly tissue. In contrast, the umbilical cord blood derived MSC population was relatively rare and contained different heterogeneous fractions of progenitor mononuclear cells (MNCs) showing characteristics of pluripotent stem (confirmed by the presence of a set of genes SRTF). In our study we found that, WJ-MSCs revealed higher proliferation rate as well as higher potential to differentiate toward neural type than BM-MSCs. Consistently, only WJ-derived MSC unveiled neural progenitor characteristics expressing panel of cellular markers typical for neural lineage i.e. Nestin, NF200, GFAP. Another feature demonstrating less differentiated state of these cells was higher expression of SSEA-4 – the antigen specific for undifferentiated cells. All together, these data allow us to hypothesize that the fetal origin of WJ tissue determines its distinguished neuro-mesenchymal characteristic.

Routinely, MSC are cultured under normoxic conditions (20% oxygen). However, in physiological situation the tension of oxygen in stem cell niches varies between 1% and 8%. We therefore examined the effects of lowered (5% oxygen) versus normoxic (20% oxygen) culture conditions on MSCs in terms of their proliferation rate and the expression of neural progenitor cell markers. Our studies have confirmed that WJ-MSC cultured in reduced oxygen (5%) proliferated more rapidly than in standard (20%) oxygen tension. We observed that in the WJ-MSC hypoxia conditions activate the expression of embryonic stem cell markers: Oct3/4, Sox2, Rex1, Nanog and hypoxia associated genes: HIF-1,2 α . Interestingly, BM-MSC cultured in lower oxygen tension do not acquire pluripotent properties.

In my research project, attention has also been focused on issues related to the epigenetic mechanisms that may control cell responses on oxygen concentration. Histone acetylation levels, controlled by the histone acetyl transferases (HATs) and histone deacetylases (HDACs), influence the accessibility of DNA to transcription factors and thereby dynamically regulate transcriptional programs. HDACs execute important functions in control of proliferation, differentiation, and the establishment of cell identities during embryonic development. To investigate the role of the HDAC family in neural differentiation, we have employed histone inhibitor Trichostatin A (TSA) which locally block enzymatic HDAC activity. We found that TSA treatment induced neural differentiation and morphologic changes in WJ-MSC_{NT} cultures. We found that TSA treatment return neural differentiation of WJ-MSC_{NT}. Moreover, our research showed that WJ-MSC_{NT} only after initial exposure to TSA responded positively to the classic neural differentiation inducers: cAMP, BDNF, RA. This phenotype was accompanied by morphological changes in mesenchymal stem cells which created a neuronal network like structures. As a molecular consequence of HDAC inhibition a timely dysregulation of HIF genes response to low oxygen was observed, illustrated by inhibition of cell division. Concomitantly, several neural specific markers, including MAP2, were induced providing evidence that HDAC activity is crucial in control of neural differentiation process in mesenchymal stem cells. In conclusion, our study confirms high plasticity of mesenchymal stem cells isolated from Wharton's jelly toward neural differentiation allowing them to be favorable condidate for cell neuroregenerative therapy.

10. SPIS PIŚMIENICTWA

1. Achyut BR, Varma NR, Arbab AS. Application of Umbilical Cord Blood Derived Stem Cells in Diseases of the Nervous System. *J Stem Cell Res Ther.* 2014;4.
2. Alvarez-Viejo M, Menéndez-Menéndez Y, Otero-Hernández J. CD271 as a marker to identify mesenchymal stem cells from diverse sources before culture. *World J Stem Cells.* 2015 Mar 26;7(2):470-6.
3. Anbari F, Khalili MA, Bahrami AR, Khoradmehr A, Sadeghian F, Fesahat F, Nabi A. Intravenous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells promotes neural regeneration after traumatic brain injury. *Neural Regen Res.* 2014 May 1;9(9):919-23.
4. Bae KS, Park JB, Kim HS, Kim DS, Park DJ, Kang SJ. Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Yonsei Med J.* 2011 May;52(3):401-12.
5. Balasubramaniyan V, Boddeke E, Bakels R, Küst B, Kooistra S, Veneman A, Copray S. Effects of histone deacetylation inhibition on neuronal differentiation of embryonic mouse neural stem cells. *Neuroscience.* 2006 Dec 28;143(4):939-51.
6. Balasubramanian S, Thej C, Venugopal P, Priya N, Zakaria Z, Sundarraj S, Majumdar AS. Higher propensity of Wharton's jelly derived mesenchymal stromal cells towards neuronal lineage in comparison to those derived from adipose and bone marrow. *Cell Biol Int.* 2013 May;37(5):507-15.
7. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell.* 2007 May 18;129(4):823-37.
8. Basciano L, Nemos C, Foliguet B, de Isla N, de Carvalho M, Tran N, Dalloul A. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biol.* 2011 Mar 30;12:12.
9. Batsali AK, Kastrinaki MC, Papadaki HA, Pontikoglou C. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2013 Mar;8(2):144-55.
10. Battula VL, Bareiss PM, Tremel S, Conrad S, Albert I, Hojak S, Abele H, Schewe B, Just L, Skutella T, Bühring HJ. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation.* 2007 Apr;75(4):279-91.
11. Beane OS, Fonseca VC, Cooper LL, Koren G, Darling EM. Impact of aging on the regenerative properties of bone marrow-, muscle-, and adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. *PLoS One.* 2014 Dec 26;9(12):e115963.
12. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, Montagna D, Maccario R, Villa R, Daidone MG, Zuffardi O, Locatelli F. Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Do Not Undergo Transformation after Long-term In vitro Culture and Do Not Exhibit Telomere Maintenance Mechanisms. *Cancer research.* 2007; 67(19):9142-9149.
13. Bhanot Y, Rao S, Ghosh D, Balaraju S, Radhika CR, Satish Kumar KV. Autologous mesenchymal stem cells in chronic spinal cord injury. *Br J Neurosurg.* 2011. 25:516-522.
14. Bi Y, Gong M, Zhang X, Zhang X, Jiang W, Zhang Y, Chen J, Liu Y, He TC, Li T. Pre-activation of retinoid signaling facilitates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells. *Dev Growth Differ.* 2010 Jun;52(5):419-31.

15. Bianco P, Cao X, Frenette PS, Mao JJ, Robey PG, Simmons PJ, Wang CY. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med.* 2013 Jan;19(1):35-42.
16. Biancone L, Bruno S, Deregibus MC, Tetta C, Camussi G. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles. *Nephrol Dial Transplant.* 2012 Aug;27(8):3037-42.
17. Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells.* 2004;22(4):625-34.
18. Boxall SA, Jones E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem Cells Int.* 2012;2012:975871.
19. Burney MJ, Johnston C, Wong KY, Teng SW, Beglopoulos V, Stanton LW, Williams BP, Bithell A, Buckley NJ. An epigenetic signature of developmental potential in neural stem cells and early neurons. *Stem Cells.* 2013 Sep;31(9):1868-80.
20. Busletta C, Novo E, Valfrè Di Bonzo L, Povero D, Paternostro C, Ievolella M, Mareschi K, Ferrero I, Cannito S, Compagnone A, Bandino A, Colombatto S, Fagioli F, Parola M. Dissection of the biphasic nature of hypoxia-induced motogenic action in bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2011 Jun;29(6):952-63.
21. Bużańska L, Machaj EK, Zabłocka B, Pojda Z, Domańska-Janik K. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. *J Cell Sci.* 2002 May 15;115(Pt 10):2131-8.
22. Bużańska L, Jurga M, Stachowiak EK, Stachowiak MK, Domańska-Janik K. Neural stem-like cell line derived from a nonhematopoietic population of human umbilical cord blood. *Stem Cells Dev.* 2006 Jun;15(3):391-406.
23. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood.* 2001 Oct 15;98(8):2396-402.
24. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 2006 Aug 1;98(5):1076-84.
25. 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 Jun;15(6):1239-53.
26. Chen J, Li C, Chen L. The Role of Microvesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells in Lung Diseases. *Biomed Res Int.* 2015;2015:985814.
27. Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One.* 2008 Apr 2;3(4):e1886.
28. Chen A, Xiong LJ, Tong Y, Mao M. The neuroprotective roles of BDNF in hypoxic ischemic brain injury. *Biomed Rep.* 2013 Mar;1(2):167-176.
29. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med.* 2014 Jan 7;12:8.
30. Choumerianou DM, Martimianaki G, Stiakaki E, Kalmanti L, Kalmanti M, Dimitriou H. Comparative study of stemness characteristics of mesenchymal cells from bone marrow of children and adults. *Cytotherapy.* 2010 Nov;12(7):881-7.

31. Chow DC, Wenning LA, Miller WM, Papoutsakis ET. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. II. Modified Kroghian models. *Biophys J*. 2001 Aug;81(2):685-96.
32. Connick P, Kolappan M, Crawley C, Webber DJ, Patani R, Michell AW, Du MQ, Luan SL, Altmann DR, Thompson AJ, Compston A, Scott MA, Miller DH, Chandran S. Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *Lancet Neurol*. 2012 Feb;11(2):150-6.
33. Cordeiro-Spinetti E, de Mello W, Trindade LS, Taub DD, Taichman RS, Balduino A. Human bone marrow mesenchymal progenitors: perspectives on an optimized in vitro manipulation. *Front Cell Dev Biol*. 2014 Mar 27;2:7.
34. Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, Labosky PA, Simon MC, Keith B. HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev*. 2006 Mar 1;20(5):557-70.
35. Crane JF, Trainor PA. Neural crest stem and progenitor cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2006;22:267-86.
36. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006 Jun 1;119(Pt 11):2204-13.
37. D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res*. 1999; 14: 1115-1122.
38. D'Ippolito G, Diabira S, Howard GA, Roos BA, Schiller PC. Low oxygen tension inhibits osteogenic differentiation and enhances stemness of human MIAMI cells. *Bone*. 2006 Sep;39(3):513-22.
39. Dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MM, da Silva CL, Cabral JM. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: a more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J Cell Physiol*. 2010 Apr;223(1):27-35.
40. Dominici M, Hofmann TJ, Horwitz EM. Bone marrow mesenchymal cells: biological properties and clinical applications. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2001 Jan-Mar;15(1):28-37.
41. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
42. Drela K, Siedlecka P, Sarnowska A, Domanska-Janik K. Human mesenchymal stem cells in the treatment of neurological diseases. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2013;73(1):38-56.
43. Drela K, Sarnowska A, Siedlecka P, Szablowska-Gadomska I, Wielgos M, Jurga M, Lukomska B, Domanska-Janik K. Low oxygen atmosphere facilitates proliferation and maintains undifferentiated state of umbilical cord mesenchymal stem cells in an hypoxia inducible factor-dependent manner. *Cytotherapy*. 2014 Jul;16(7):881-92.
44. Eliasson P, Jönsson JI. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol*. 2010 Jan;222(1):17-22.
45. Eming SA, Krieg T. Molecular mechanisms of VEGF-A action during tissue repair. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2006 Sep;11(1):79-86.
46. Erecińska M, Silver IA. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol*. 2001 Nov 15;128(3):263-76.

47. Fan CG, Zhang QJ, Tang FW, Han ZB, Wang GS, Han ZC. Human umbilical cord blood cells express neurotrophic factors. *Neurosci Lett.* 2005 Jun 3;380(3):322-5.
48. Fanarraga ML, Avila J, Zabala JC. Expression of unphosphorylated class III beta-tubulin isotype in neuroepithelial cells demonstrates neuroblast commitment and differentiation. *Eur J Neurosci.* 1999 Feb;11(2):517-27.
49. Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitinger S, Kloss F, Güllly C, Gassner R, Lepperdinger G. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell.* 2007 Dec;6(6):745-57.
50. Ferroni L, Gardin C, Tocco I, Epis R, Casadei A, Vindigni V, Mucci G, Zavan B. Potential for neural differentiation of mesenchymal stem cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2013;129:89-115.
51. Forbes GM, Sturm MJ, Leong RW, Sparrow MP, Segarajasingam D, Cummins AG, Phillips M, Herrmann RP. A phase 2 study of allogeneic mesenchymal stromal cells for luminal Crohn's disease refractory to biologic therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014 Jan;12(1):64-71.
52. Forristal CE, Wright KL, Hanley NA, Oreffo RO, Houghton FD. Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction.* 2010 Jan;139(1):85-97.
53. Foster K, Sheridan J, Veiga-Fernandes H, Roderick K, Pachnis V, Adams R, Blackburn C, Kioussis D, Coles M. Contribution of neural crest-derived cells in the embryonic and adult thymus. *J Immunol.* 2008 Mar 1;180(5):3183-9.
54. Foti SB, Chou A, Moll AD, Roskams AJ. HDAC inhibitors dysregulate neural stem cell activity in the postnatal mouse brain. *Int J Dev Neurosci.* 2013 Oct;31(6):434-47.
55. Foudah D, Monfrini M, Donzelli E, Niada S, Brini AT, Orciani M, Tredici G, Miloso M. Expression of neural markers by undifferentiated mesenchymal-like stem cells from different sources. *J Immunol Res.* 2014;2014:987678.
56. Foudah D, Redondo J, Caldara C, Carini F, Tredici G, Miloso M. Human mesenchymal stem cells express neuronal markers after osteogenic and adipogenic differentiation. *Cell Mol Biol Lett.* 2013 Jun;18(2):163-86.
57. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2006 Apr;24(4):150-4.
58. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976 Sep;4(5):267-74.
59. Frith JE, Thomson B, Genever PG. Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010 Aug;16(4):735-49.
60. Estrada JC, Albo C, Benguría A, Dopazo A, López-Romero P, Carrera-Quintanar L, Roche E, Clemente EP, Enríquez JA, Bernad A, Samper E. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell Death Differ.* 2012 May;19(5):743-55.
61. Fu L, Zhu L, Huang Y, Lee TD, Forman SJ, Shih CC. Derivation of neural stem cells from mesenchymal stem cells: evidence for a bipotential stem cell population. *Stem Cells Dev.* 2008 Dec;17(6):1109-21.

62. Fujimura J, Sugihara H, Fukunaga Y, Suzuki H, Ogawa R. Adipose Tissue is A Better Source of Immature Non-Hematopoietic Cells than Bone Marrow. *Int J Stem Cells*. 2009 May;2(2):135-40.
63. Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood*. 2007 Feb 15;109(4):1743-51.
64. Gaspar-Maia A, Alajem A, Meshorer E, Ramalho-Santos M. Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Jan;12(1):36-47.
65. Gassmann M, Fandrey J, Bichet S, Wartenberg M, Marti HH, Bauer C, Wenger RH, Acker H. Oxygen supply and oxygen-dependent gene expression in differentiating embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 2;93(7):2867-72.
66. Ge J, Guo L, Wang S, Zhang Y, Cai T, Zhao RC, Wu Y. The size of mesenchymal stem cells is a significant cause of vascular obstructions and stroke. *Stem Cell Rev*. 2014 Apr;10(2):295-303.
67. Gordan JD, Thompson CB, Simon MC. HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell*. 2007 Aug;12(2):108-13.
68. Gordon T. The role of neurotrophic factors in nerve regeneration. *Neurosurg Focus*. 2009 Feb;26(2):E3.
69. Gornicka-Pawlak, Janowski M, Habich A, Jablonska A, Drela K, Kozłowska H, Lukomska B, Sypecka J, Domanska-Janik K. Systemic treatment of focal brain injury in the rat by human umbilical cord blood cells being at different level of neural commitment. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2011;71(1):46-64.
70. Gornicka-Pawlak E, Janowski M, Jablonska A, Sypecka J, Domanska-Janik K. Complex assessment of distinct cognitive impairments following ouabain injection into the rat dorsolateral striatum. *Behav Brain Res*. 2015 Aug 1;289:133-40.
71. Götherström C, Westgren M, Shaw SW, Aström E, Biswas A, Byers PH, Mattar CN, Graham GE, Taslimi J, Ewald U, Fisk NM, Yeoh AE, Lin JL, Cheng PJ, Choolani M, Le Blanc K, Chan JK Pre- and postnatal transplantation of fetal mesenchymal stem cells in osteogenesis imperfecta: a two-center experience. *Stem Cells Transl Med*. 2014 Feb;3(2):255-64.
72. Gray SG, Ekström TJ. The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res*. 2001 Jan 15;262(2):75-83.
73. Greco SJ, Liu K, Rameshwar P. Functional similarities among genes regulated by OCT4 in human mesenchymal and embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2007 Dec;25(12):3143-54.
74. Grisendi G, Bussolari R, Cafarelli L, Petak I, Rasini V, Veronesi E, De Santis G, Spano C, Tagliazzucchi M, Barti-Juhász H, Scarabelli L, Bambi F, Frassoldati A, Rossi G, Casali C, Morandi U, Horwitz EM, Paolucci P, Conte P, Dominici M. Adipose-derived mesenchymal stem cells as stable source of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand delivery for cancer therapy. *Cancer Res*. 2010 May 1;70(9):3718-29.
75. Gu N, Rao C, Tian Y, Di Z, Liu Z, Chang M, Lei H. Anti-inflammatory and antiapoptotic effects of mesenchymal stem cells transplantation in rat brain with cerebral ischemia. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014 Nov-Dec;23(10):2598-606.
76. Gulotta LV, Chaudhury S, Wiznia D. Stem cells for augmenting tendon repair. *Stem Cells Int*. 2012;2012:291431.
77. Guarnerio J, Coltella N, Ala U, Tonon G, Pandolfi PP, Bernardi R. Bone marrow endosteal mesenchymal progenitors depend on HIF factors for maintenance and regulation of hematopoiesis. *Stem Cell Reports*. 2014 May 15;2(6):794-809.

78. Guillot PV, Gotherstrom C, Chan J, Kurata H, Fisk NM. Human first-trimester fetal MSC express pluripotency markers and grow faster and have longer telomeres than adult MSC. *Stem Cells*. 2007 Mar;25(3):646-54.
79. Halfon S, Abramov N, Grinblat B, Ginis I. Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. *Stem Cells Dev*. 2011 Jan;20(1):53-66.
80. Habich A, Jurga M, Markiewicz I, Lukomska B, Bany-Laszewicz U, Domanska-Janik K. Early appearance of stem/progenitor cells with neural-like characteristics in human cord blood mononuclear fraction cultured in vitro. *Exp Hematol*. 2006 Jul;34(7):914-25.
81. Habich A, Domanska-Janik K. Aggregation-promoted expansion of neurally committed human umbilical cord blood progenitors in vitro. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2011;71(1):1-11.
82. Han B, Li J, Li Z, Guo L, Wang S, Liu P, Wu Y. Trichostatin A stabilizes the expression of pluripotent genes in human mesenchymal stem cells during ex vivo expansion. *PLoS One*. 2013 Nov 27;8(11):e81781.
83. Hao Y, Creson T, Zhang L, Li P, Du F, Yuan P, Gould TD, Manji HK, Chen G. Mood stabilizer valproate promotes ERK pathway-dependent cortical neuronal growth and neurogenesis. *J Neurosci*. 2004 Jul 21;24(29):6590-9.
84. Haque N, Rahman MT, Abu Kasim NH, Alabsi AM. Hypoxic culture conditions as a solution for mesenchymal stem cell based regenerative therapy. *ScientificWorldJournal*. 2013 Aug 27;2013:632972.
85. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, Tracy M, Ghersin E, Johnston PV, Brinker JA, Breton E, Davis-Sproul J, Schulman IH, Byrnes J, Mendizabal AM, Lowery MH, Rouy D, Altman P, Wong Po Foo C, Ruiz P, Amador A, Da Silva J, McNiece IK, Heldman AW, George R, Lardo A. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA*. 2012 Dec 12;308(22):2369-79.
86. Harvey AJ, Kind KL, Pantaleon M, Armstrong DT, Thompson JG. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Biol Reprod*. 2004 Oct;71(4):1108-19.
87. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. 2011 May 14;9:12.
88. He H, Nagamura-Inoue T, Tsunoda H, Yuzawa M, Yamamoto Y, Yorozu P, Agata H, Tojo A. Stage-specific embryonic antigen 4 in Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells is not a marker for proliferation and multipotency. *Tissue Eng Part A*. 2014 Apr;20(7-8):1314-24.
89. Hemphill JC 3rd, Smith WS, Sonne DC, Morabito D, Manley GT. Relationship between brain tissue oxygen tension and CT perfusion: feasibility and initial results. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2005 May;26(5):1095-100.
90. Hermann A, List C, Habisch HJ, Vukicevic V, Ehrhart-Bornstein M, Brenner R, Bernstein P, Fickert S, Storch A. Age-dependent neuroectodermal differentiation capacity of human mesenchymal stromal cells: limitations for autologous cell replacement strategies. *Cytotherapy*. 2010;12(1):17-30.
91. Hoch AI, Leach J. Concise review: optimizing expansion of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells for clinical applications. *Stem Cells Transl Med*. 2014 May;3(5):643-52.

92. Holzwarth C, Vaegler M, Gieseke F, Pfister SM, Handgretinger R, Kerst G, Müller I. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC Cell Biol.* 2010 Jan 28;11:11.
93. Hoogduijn MJ, Popp F, Verbeek R, Masoodi M, Nicolaou A, Baan C, Dahlke MH. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *Int Immunopharmacol.* 2010 Dec;10(12):1496-500.
94. Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK, Marx JC, Neel MD, McNall RY, Muul L, Hofmann T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jun 25;99(13):8932-7.
95. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393-5.
96. Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, Mejia E, Gage FH. Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Nov 23;101(47):16659-64.
97. Huang EJ, Reichardt LF. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 2003;72:609-42.
98. Hubbard JJ, Sullivan SK, Mills JA, Hayes BJ, Torok-Storb BJ, Ramakrishnan A4. Efficient iPS cell generation from blood using episomes and HDAC inhibitors. *J Vis Exp.* 2014 Oct 28;(92):e52009.
99. Hung SC, Pochampally RR, Hsu SC, Sanchez C, Chen SC, Spees J, Prockop DJ. Short-term exposure of multipotent stromal cells to low oxygen increases their expression of CX3CR1 and CXCR4 and their engraftment in vivo. *PLoS One.* 2007 May 2;2(5):e416.
100. Im GI, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage.* 2005 Oct;13(10):845-53.
101. Ishii M, Arias AC, Liu L, Chen YB, Bronner ME, Maxson RE. A stable cranial neural crest cell line from mouse. *Stem Cells Dev.* 2012 Nov 20;21(17):3069-80.
102. Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J Cell Physiol.* 2009 May;219(2):271-5.
103. Jablonska A, Kozłowska H, Markiewicz I, Domanska-Janik K, Lukomska B. Transplantation of neural stem cells derived from human cord blood to the brain of adult and neonatal rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2010;70(4):337-50.
104. Jewell UR, Kvietikova I, Scheid A, Bauer C, Wenger RH, Gassmann M. Induction of HIF-1 α in response to hypoxia is instantaneous. *FASEB J.* 2001 May;15(7):1312-4.
105. Jez M, Ambady S, Kashpur O, Grella A, Malcuit C, Vilner L, Rozman P, Dominko T. Expression and differentiation between OCT4A and its Pseudogenes in human ESCs and differentiated adult somatic cells. *PLoS One.* 2014 Feb 24;9(2):e89546.
106. Ji R, Zhang N, You N, Li Q, Liu W, Jiang N, Liu J, Zhang H, Wang D, Tao K, Dou K. The differentiation of MSCs into functional hepatocyte-like cells in a liver biomatrix scaffold and their transplantation into liver-fibrotic mice. *Biomaterials.* 2012 Dec;33(35):8995-9008.
107. Jin HJ, Bae YK, Kim M, Kwon SJ, Jeon HB, Choi SJ, Kim SW, Yang YS, Oh W, Chang JW. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose

- tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int J Mol Sci.* 2013 Sep 3;14(9):17986-8001.
108. Josselyn SA, Nguyen PV. CREB, synapses and memory disorders: past progress and future challenges. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2005 Oct;4(5):481-97.
 109. Jori FP, Napolitano MA, Melone MA, Cipollaro M, Cascino A, Altucci L, Peluso G, Giordano A, Galderisi U. Molecular pathways involved in neural in vitro differentiation of marrow stromal stem cells. *J Cell Biochem.* 2005 Mar 1;94(4):645-55.
 110. Jorjani P, Ozturk SS. Effects of cell density and temperature on oxygen consumption rate for different mammalian cell lines. *Biotechnol Bioeng.* 1999 Aug 5;64(3):349-56.
 111. Juliandi B, Abematsu M, Nakashima K. Chromatin remodeling in neural stem cell differentiation. *Curr Opin Neurobiol.* 2010 Aug;20(4):408-15.
 112. Junker JP, Sommar P, Skog M et al. Adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation of clonally derived human dermal fibroblasts. *Cells Tissues Organs* 2010;191:105–118.
 113. Kaltz N, Ringe J, Holzwarth C, Charbord P, Niemeyer M, Jacobs VR, Peschel C, Häupl T, Oostendorp RA. Novel markers of mesenchymal stem cells defined by genome-wide gene expression analysis of stromal cells from different sources. *Exp Cell Res.* 2010 Oct 1;316(16):2609-17.
 114. Kandel ER. The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Mol Brain.* 2012 May 14;5:1.
 115. Katsetos CD, Herman MM, Mörk SJ. Class III beta-tubulin in human development and cancer. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2003 Jun;55(2):77-96.
 116. Kelamangalath L, Smith GM. Neurotrophin treatment to promote regeneration after traumatic CNS injury. *Front Biol (Beijing).* 2013 Oct 1;8(5):486-495.
 117. Kim JH, Lee HJ, Song YS. Stem cell based gene therapy in prostate cancer. *Biomed Res Int.* 2014;2014:549136.
 118. Kim SS, Choi JM, Kim JW, Ham DS, Ghil SH, Kim MK, Kim-Kwon Y, Hong SY, Ahn SC, Kim SU, Lee YD, Suh-Kim H. cAMP induces neuronal differentiation of mesenchymal stem cells via activation of extracellular signal-regulated kinase/MAPK. *Neuroreport.* 2005 Aug 22;16(12):1357-61.
 119. Kishk NA, Gabr H, Hamdy S, Afifi L, Abokresha N, Mahmoud H, Wafaie A, Bilal D. Case control series of intrathecal autologous bone marrow mesenchymal stem cell therapy for chronic spinal cord injury. *Neurorehabil Neural Repair.* 2010 Oct;24(8):702-8.
 120. Kitagawa Y, Korobi M, Toriyama K, Kamei Y, Tori S. History of discovery of human adipose-derived stem cells and their clinical application. *Jpn J Plast Reconstr Surg.* 2006;118(3 Suppl):121S–8.
 121. Kundrotas G. Surface markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts *ACTA MEDICA LITUANICA.* 2012. Vol. 19. No. 2. P. 75–79.
 122. Kuroda Y, Kitada M, Wakao S et al. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:8639–8643.
 123. Lai CP, Breakefield XO. Role of exosomes/microvesicles in the nervous system and use in emerging therapies. *Front Physiol.* 2012 Jun 27;3:228.

124. Lanctot PM, Gage FH, Varki AP. The glycans of stem cells. *Curr Opin Chem Biol.* 2007 Aug;11(4):373-80.
125. Lavrentieva A, Majore I, Kasper C, Hass R. Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell Commun Signal.* 2010 Jul 16;8:18.
126. Lee M, Jeong SY, Ha J, Kim M, Jin HJ, Kwon SJ, Chang JW, Choi SJ, Oh W, Yang YS, Kim JS, Jeon HB. Low immunogenicity of allogeneic human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Apr 18;446(4):983-9.
127. Lee SH, Lee YJ, Song CH, Ahn YK, Han HJ. Role of FAK phosphorylation in hypoxia-induced hMSCS migration: involvement of VEGF as well as MAPKS and eNOS pathways. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010 Apr;298(4):C847-56.
128. Lepski G, Jannes CE, Maciaczyk J, Papazoglou A, Mehlhorn AT, Kaiser S, Teixeira MJ, Marie SK, Bischofberger J, Nikkhah G. Limited Ca²⁺ and PKA-pathway dependent neurogenic differentiation of human adult mesenchymal stem cells as compared to fetal neuronal stem cells. *Exp Cell Res.* 2010 Jan 15;316(2):216-31.
129. Li M, Zhang SZ, Guo YW, Cai YQ, Yan ZJ, Zou Z, Jiang XD, Ke YQ, He XY, Jin ZL, Lu GH, Su DQ. Human umbilical vein-derived dopaminergic-like cell transplantation with nerve growth factor ameliorates motor dysfunction in a rat model of Parkinson's disease. *Neurochem Res.* 2010 Oct;35(10):1522-9.
130. Liedtke S, Stephan M, Kögler G. Oct4 expression revisited: potential pitfalls for data misinterpretation in stem cell research. *Biol Chem.* 2008 Jul;389(7):845-50.
131. Lim JY, Park SI, Kim SM, Jun JA, Oh JH, Ryu CH, Jeong CH, Park SH, Park SA, Oh W, Chang JW, Jeun SS. Neural differentiation of brain-derived neurotrophic factor-expressing human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in culture via TrkB-mediated ERK and β -catenin phosphorylation and following transplantation into the developing brain. *Cell Transplant.* 2011;20(11-12):1855-66.
132. Lim JY, Park SI, Oh JH, Kim SM, Jeong CH, Jun JA, Lee KS, Oh W, Lee JK, Jeun SS. Brain-derived neurotrophic factor stimulates the neural differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells and survival of differentiated cells through MAPK/ERK and PI3K/Akt-dependent signaling pathways. *J Neurosci Res.* 2008. 86(10): p. 2168-78.
133. Lindenmair A, Hatlapatka T, Kollwig G, Hennerbichler S, Gabriel C, Wolbank S, Redl H, Kasper C. Mesenchymal stem or stromal cells from amnion and umbilical cord tissue and their potential for clinical applications. *Cells.* 2012 Nov 12;1(4):1061-88.
134. Liu H, Wu H, Wang Y, Wang Y, Wu X, Ju S, Wang X. Inhibition of class II histone deacetylase blocks proliferation and promotes neuronal differentiation of the embryonic rat neural progenitor cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2012;72(4):365-76.
135. Liu Q, Cheng G, Wang Z, Zhan S, Xiong B, Zhao X. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate into nerve-like cells in vitro after transfection with brain-derived neurotrophic factor gene. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2015 Mar;51(3):319-27.
136. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8.
137. Ljujic B, Milovanovic M, Volarevic V, Murray B, Bugarski D, Przyborski S, Arsenijevic N, Lukic ML, Stojkovic M. Human mesenchymal stem cells creating an immunosuppressive environment and promote breast cancer in mice. *Sci Rep.* 2013;3:2298.

138. López Y, Lutjemeier B, Seshareddy K, Trevino EM, Hageman KS, Musch TI, Borgarelli M, Weiss ML. Wharton's jelly or bone marrow mesenchymal stromal cells improve cardiac function following myocardial infarction for more than 32 weeks in a rat model: a preliminary report. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2013 Jan;8(1):46-59.
139. Lorenz K, Sicker M, Schmelzer E et al. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp Dermatol* 2008;17:925-932.
140. Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, Han ZB, Xu ZS, Lu YX, Liu D, Chen ZZ, Han ZC Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica.* 2006 Aug;91(8):1017-26.
141. Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2014 Jun;32(6):1408-19.
142. Lupatov AY, Vdovin AS, Vakhrushev IV, Poltavtseva RA, Yarygin KN. Comparative analysis of the expression of surface markers on fibroblasts and fibroblast-like cells isolated from different human tissues. *Bull Exp Biol Med.* 2015 Feb;158(4):537-43.
143. Lykissas MG, Batistatou AK, Charalabopoulos KA, Beris AE. The role of neurotrophins in axonal growth, guidance, and regeneration. *Curr Neurovasc Res.* 2007 May;4(2):143-51.
144. MacDonald JL, Roskams AJ. Histone deacetylases 1 and 2 are expressed at distinct stages of neuro-glial development. *Dev Dyn.* 2008 Aug;237(8):2256-67.
145. Machalińska A, Rogińska D2, Pius-Sadowska E, Kawa MP, Paczkowska E, Rudnicki M2, Lejkowska R, Baumert B, Wiszniewska B3, Machaliński B. Neuroprotective and antiapoptotic activity of lineage-negative bone marrow cells after intravitreal injection in a mouse model of acute retinal injury. *Stem Cells Int.* 2015;2015:620364.
146. Machaliński B, Łażewski-Banaszak P, Dąbkowska E, Paczkowska E, Gołąb-Janowska M, Nowacki P. [The role of neurotrophic factors in regeneration of the nervous system]. *Neurol Neurochir Pol.* 2012 Nov-Dec;46(6):579-90.
147. Maden M. Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2002 Nov;3(11):843-53.
148. Maltman DJ, Hardy SA, Przyborski SA. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. *Neurochem Int.* 2011 Sep;59(3):347-56.
149. Mantamadiotis T, Lemberger T, Bleckmann SC, Kern H, Kretz O, Martin Villalba A, Tronche F, Kellendonk C, Gau D, Kapfhammer J, Otto C, Schmid W, Schütz G. Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nat Genet.* 2002 May;31(1):47-54. Epub 2002 Apr 22.
150. Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng.* 2007 May;13(5):947-55.
151. Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica.* 2001 Oct;86(10):1099-100.
152. Mareschi K, Novara M, Rustichelli D, Ferrero I, Guido D, Carbone E, Medico E, Madon E, Vercelli A, Fagioli F. Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: Evidence for expression of neural markers and eag K+ channel types. *Exp Hematol.* 2006 Nov;34(11):1563-72.

153. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, Ko MS, Niwa H. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 2007 Jun;9(6):625-35.
154. Mazzocca AD, McCarthy MB, Chowaniec DM, Cote MP, Arciero RA, Drissi H. Rapid isolation of human stem cells (connective tissue progenitor cells) from the proximal humerus during arthroscopic rotator cuff surgery. *Am J Sports Med.* 2010 Jul;38(7):1438-47.
155. Mavroudi M, Zarogoulidis P, Porpodis K, Kioumis I, Lampaki S, Yarmus L, Malecki R, Zarogoulidis K, Malecki M. Stem cells' guided gene therapy of cancer: New frontier in personalized and targeted therapy. *J Cancer Res Ther (Manch).* 2014;2(1):22-33.
156. McGuckin CP, Forraz N, Allouard Q, Pettengell R. Umbilical cord blood stem cells can expand hematopoietic and neuroglial progenitors in vitro. *Exp Cell Res.* 2004 May 1;295(2):350-9.
157. Melief SM, Zwaginga JJ, Fibbe WE, Roelofs H. Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. *Stem Cells Transl Med.* 2013 Jun;2(6):455-63.
158. Miller FD. Riding the waves: neural and nonneural origins for mesenchymal stem cells. *Cell Stem Cell.* 2007 Aug 16;1(2):129-30.
159. Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V, Seo BM, Sonoyama W, Zheng JJ, Baker CC, Chen W, Ried T, Shi S. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells.* 2006; 24(4):1095–1103.
160. Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche *Cell Stem Cell.* 2010 Aug 6;7(2):150-61.
161. Montgomery RL, Hsieh J, Barbosa AC, Richardson JA, Olson EN. Histone deacetylases 1 and 2 control the progression of neural precursors to neurons during brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 May 12;106(19):7876-81.
162. Moretti P, Hatlapatka T, Marten D, Lavrentieva A, Majore I, Hass R, Kasper C. Mesenchymal stromal cells derived from human umbilical cord tissues: primitive cells with potential for clinical and tissue engineering applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2010;123:29-54.
163. Morikawa S, Mabuchi Y, Niibe K, Suzuki S, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Nagai Y, Nakagawa T, Okano H, Matsuzaki Y. Development of mesenchymal stem cells partially originate from the neural crest. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Feb 20;379(4):1114-9.
164. Nagamura-Inoue T, He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World Journal of Stem Cells* 2014;6(2):195-202.
165. Nagoshi N, Shibata S, Kubota Y, Nakamura M, Nagai Y, Satoh E, Morikawa S, Okada Y, Mabuchi Y, Katoh H, Okada S, Fukuda K, Suda T, Matsuzaki Y, Toyama Y, Okano H. Ontogeny and multipotency of neural crest-derived stem cells in mouse bone marrow, dorsal root ganglia, and whisker pad. *Cell Stem Cell.* 2008 Apr 10;2(4):392-403.
166. Nekanti U, Rao VB, Bahirvani AG, Jan M, Totey S, Ta M Long-term expansion and pluripotent marker array analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2010 Jan;19(1):117-30.
167. Nie Y, Han BM, Liu XB, Yang JJ, Wang F, Cong XF, Chen X. Identification of MicroRNAs involved in hypoxia- and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Int J Biol Sci.* 2011;7(6):762-8.

168. Ninagawa N, Murakami R, Isobe E, Tanaka Y, Nakagawa H, Torihashi S. Mesenchymal stem cells originating from ES cells show high telomerase activity and therapeutic benefits. *Differentiation*. 2011 Oct;82(3):153-64. 19.
169. Koutsounas I, Giaginis C, Theocharis S. Histone deacetylase inhibitors and pancreatic cancer: are there any promising clinical trials? *World J Gastroenterol*. 2013 Feb 28;19(8):1173-81.
170. Ogura F, Wakao S, Kuroda Y, Tsuchiyama K, Bagheri M, Heneidi S, Chazenbalk G, Aiba S, Dezawa M. Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with nontumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. *Stem Cells Dev*. 2014 Apr 1;23(7):717-28.
171. Paczkowska E, Kaczyńska K, Pius-Sadowska E, Rogińska D, Kawa M, Ustianowski P, Safranow K, Celewicz Z, Machaliński B. Humoral activity of cord blood-derived stem/progenitor cells: implications for stem cell-based adjuvant therapy of neurodegenerative disorders. *PLoS One*. 2013 Dec 31;8(12):e83833.
172. Paczkowska E, Rogińska D, Pius-Sadowska E, Jurewicz A, Piecyk K, Safranow K, Dzieziejko V, Grzegorzółka R, Bohatyrewicz A, Machaliński B. Evidence for proangiogenic cellular and humoral systemic response in patients with acute onset of spinal cord injury. *J Spinal Cord Med*. 2014 Jun 26.
173. Palomäki S, Pietilä M, Laitinen S, Pesälä J, Sormunen R, Lehenkari P, Koivunen P. HIF-1 α is upregulated in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2013 Sep;31(9):1902-9.
174. Panchision DM. The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. *J Cell Physiol*. 2009 Sep;220(3):562-8.
175. Patel SA, Simon MC. Biology of hypoxia-inducible factor-2 α in development and disease. *Cell Death Differ*. 2008 Apr;15(4):628-34.
176. Pascarica M, Sereda OR, Redman LM, Albarado DC, Hymel DT, Roan LE, Rood JC, Burk DH, Smith SR. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes*. 2009 Mar;58(3):718-25.
177. Papadimitropoulos A, Piccinini E, Brachat S, Braccini A, Wendt D, Barbero A, Jacobi C, Martin I. Expansion of human mesenchymal stromal cells from fresh bone marrow in a 3D scaffold-based system under direct perfusion. *PLoS One*. 2014 Jul 14;9(7):e102359.
178. Park IH, Kim KH, Choi HK, Shim JS, Whang SY, Hahn SJ, Kwon OJ, Oh IH. Constitutive stabilization of hypoxia-inducible factor α selectively promotes the self-renewal of mesenchymal progenitors and maintains mesenchymal stromal cells in an undifferentiated state. *Exp Mol Med*. 2013 Sep 27;45:e44.
179. Pelosi E, Castelli G, Testa U. Human umbilical cord is a unique and safe source of various types of stem cells suitable for treatment of hematological diseases and for regenerative medicine. *Blood Cells Mol Dis*. 2012 Jun 15;49(1):20-8.
180. Pevsner-Fischer M, Levin S, Zipori D. The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. *Stem Cell Rev*. 2011 Sep;7(3):560-8.
181. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45.
182. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.

183. Pogodina MV, Buravkova LB. Expression of hypoxia-associated genes in multipotent mesenchymal stromal cells during long-term cultivation at low oxygen. *Dokl Biol Sci.* 2014 Sep;458(1):310-2.
184. Potier E, Ferreira E, Meunier A, Sedel L, Logeart-Avramoglou D, Petite H. Prolonged hypoxia concomitant with serum deprivation induces massive human mesenchymal stem cell death. *Tissue Eng.* 2007 Jun;13(6):1325-31.
185. Potier E, Ferreira E, Andriamanalijaona R, Pujol JP, Oudina K, Logeart-Avramoglou D, Petite H. Hypoxia affects mesenchymal stromal cell osteogenic differentiation and angiogenic factor expression. *Bone.* 2007 Apr;40(4):1078-87.
186. Raisi A, Azizi S, Delirez N, Heshmatian B, Farshid AA, Amini K. The mesenchymal stem cell-derived microvesicles enhance sciatic nerve regeneration in rat: a novel approach in peripheral nerve cell therapy. *J Trauma Acute Care Surg.* 2014 Apr;76(4):991-7.
187. Reichardt LF. Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006 Sep 29;361(1473):1545-64.
188. Ribeiro J, Gartner A, Pereira T, Gomes R, Lopes MA, Gonçalves C, Varejão A, Luís AL, Maurício AC. Perspectives of employing mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of the umbilical cord for peripheral nerve repair. *Int Rev Neurobiol.* 2013;108:79-120.
189. Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, Hoogduijn M, Jankovskis G, Muiznieks I, Muceniece R, Ancans J. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev.* 2009 Dec;5(4):378-86.
190. Rooney GE, Howard L, O'Brien T, Windebank AJ, Barry FP. Elevation of cAMP in mesenchymal stem cells transiently upregulates neural markers rather than inducing neural differentiation. *Stem Cells Dev.* 2009 Apr;18(3):387-98.
191. Rosová I, Dao M, Capoccia B, Link D, Nolte JA. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2008 Aug;26(8):2173-82.
192. Sabin K, Kikyo N. Microvesicles as mediators of tissue regeneration. *Transl Res.* 2014 Apr;163(4):286-95.
193. Sadan O, Shemesh N, Barzilay R, Dadon-Nahum M, Blumenfeld-Katzir T, Assaf Y, Yeshurun M, Djaldetti R, Cohen Y, Melamed E, Offen D. Mesenchymal stem cells induced to secrete neurotrophic factors attenuate quinolinic acid toxicity: a potential therapy for Huntington's disease. *Exp Neurol.* 2012 Apr;234(2):417-27.
194. Sarnowska A, Jablonska A, Jurga M, Dainiak M, Strojek L, Drela K, Wright K, Tripathi A, Kumar A, Jungvid H, Lukomska B, Forraz N, McGuckin C, Domanska-Janik K. Encapsulation of mesenchymal stem cells by bioscaffolds protects cell survival and attenuates neuroinflammatory reaction in injured brain tissue after transplantation. *Cell Transplant.* 2013;22 Suppl 1:S67-82.
195. Scintu F, Reali C, Pillai R, Badiali M, Sanna MA, Argioli F, Ristaldi MS, Sogos V. Differentiation of human bone marrow stem cells into cells with a neural phenotype: diverse effects of two specific treatments. *BMC Neurosci.* 2006 Feb 16;7:14.
196. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003 Oct;3(10):721-32.
197. Semenza GL. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda).* 2004 Aug;19:176-82.

198. Semenza GL, Shimoda LA, Prabhakar NR. Regulation of gene expression by HIF-1. *Novartis Found Symp.* 2006;272:2-8.
199. Sharp FR, Bernaudin M. HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2004 Jun;5(6):437-48.
200. Siegel G, Kluba T, Hermanutz-Klein U, Bieback K, Northoff H, Schäfer R. Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Med.* 2013 Jun 11;11:146.
201. Silva EA, Mooney DJ. Effects of VEGF temporal and spatial presentation on angiogenesis. *Biomaterials.* 2010 Feb;31(6):1235-41.
202. Sinkevicius KW, Kriegel C, Bellaria KJ, Lee J, Lau AN, Leeman KT, Zhou P, Beede AM, Fillmore CM, Caswell D, Barrios J, Wong KK, Sholl LM, Schlaeger TM, Bronson RT, Chirieac LR, Winslow MM, Haigis MC, Kim CF. Neurotrophin receptor TrkB promotes lung adenocarcinoma metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Jul 15;111(28):10299-304.
203. Stephen LJ. Drug treatment of epilepsy in elderly people: focus on valproic Acid. *Drugs Aging.* 2003;20(2):141-52.
204. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone.* 2003 Dec;33(6):919-26.
205. Suila H, Pitkänen V, Hirvonen T, Heiskanen A, Anderson H, Laitinen A, Natunen S, Miller-Podraza H, Satomaa T, Natunen J, Laitinen S, Valmu L. Are globoseries glycosphingolipids SSEA-3 and -4 markers for stem cells derived from human umbilical cord blood? *J Mol Cell Biol.* 2011 Apr;3(2):99-107.
206. Svechnikova I, Almqvist PM, Ekström TJ. HDAC inhibitors effectively induce cell type-specific differentiation in human glioblastoma cell lines of different origin. *Int J Oncol.* 2008 Apr;32(4):821-7.
207. Stolzing A, Jones E, McGonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev.* 2008 Mar;129(3):163-73.
208. Storch A, Schwarz J. Neural stem cells and Parkinson's disease. *J Neurol.* 2002 Oct;249 Suppl 3:III/30-2.
209. Szablowska-Gadomska I, Zayat V, Buzanska L. Influence of low oxygen tensions on expression of pluripotency genes in stem cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2011;71(1):86-93.
210. Szade K, Bukowska-Strakova K, Nowak WN, Szade A, Kachamakova-Trojanowska N, Zukowska M, Jozkowicz A, Dulak J. Murine bone marrow Lin⁻Sca⁻¹CD45⁻ very small embryonic-like (VSEL) cells are heterogeneous population lacking Oct-4A expression. *PLoS One.* 2013 May 17;8(5):e63329.
211. Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG, Nishikawa S. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell.* 2007 Jun 29;129(7):1377-88.
212. Tang Q, Chen Q, Lai X, Liu S, Chen Y, Zheng Z, Xie Q, Maldonado M, Cai Z, Qin S, Ho G, Ma L. Malignant transformation potentials of human umbilical cord mesenchymal stem cells both spontaneously and via 3-methylcholanthrene induction. *PLoS One.* 2013 Dec 10;8(12):e81844.

213. Tantrawatpan C, Manochantr S, Kheolamai P, U-Pratya Y, Supokawej A, Issaragrisil S. Pluripotent gene expression in mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly and their differentiation potential to neural-like cells. *J Med Assoc Thai.* 2013 Sep;96(9):1208-17.
214. Taran R, Mamidi MK, Singh G, Dutta S, Parhar IS, John JP, Bhonde R, Pal R, Das AK. In vitro and in vivo neurogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from different sources. *J Biosci.* 2014 Mar;39(1):157-69.
215. Trzaska KA, Kuzhikandathil EV, Rameshwar P. Specification of a dopaminergic phenotype from adult human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2007 Nov;25(11):2797-808.
216. Tatard VM, D'Ippolito G, Diabira S, Valeyev A, Hackman J, McCarthy M, Bouckenoghe T, Menei P, Montero-Menei CN, Schiller PC. Neurotrophin-directed differentiation of human adult marrow stromal cells to dopaminergic-like neurons. *Bone.* 2007 Feb;40(2):360-73.
217. Tio M, Tan KH, Lee W, Wang TT, Udolph G. Roles of db-cAMP, IBMX and RA in aspects of neural differentiation of cord blood derived mesenchymal-like stem cells. *PLoS One.* 2010 Feb 24;5(2):e9398.
218. Tondreau T, Lagneaux L, Dejeneffe M, Massy M, Mortier C, Delforge A, Bron D. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation.* 2004 Sep;72(7):319-26.
219. Ullah M, Stich S, Notter M, Eucker J, Sittinger M, Ringe J. Transdifferentiation of mesenchymal stem cells-derived adipogenic-differentiated cells into osteogenic- or chondrogenic-differentiated cells proceeds via dedifferentiation and have a correlation with cell cycle arresting and driving genes. *Differentiation.* 2013 Feb;85(3):78-90.
220. Wakabayashi K, Nagai A, Sheikh AM, Shiota Y, Narantuya D, Watanabe T, Masuda J, Kobayashi S, Kim SU, Yamaguchi S. Transplantation of human mesenchymal stem cells promotes functional improvement and increased expression of neurotrophic factors in a rat focal cerebral ischemia model. *J Neurosci Res.* 2010 Apr;88(5):1017-25.
221. Wakitani S, Okabe T, Horibe S, Mitsuoka T, Saito M, Koyama T, Nawata M, Tensho K, Kato H, Uematsu K, Kuroda R, Kurosaka M, Yoshiya S, Hattori K, Ohgushi H. Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011 Feb;5(2):146-50.
222. Wang S, Qu X, Zhao RC. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J Hematol Oncol.* 2012 Apr 30;5:19.
223. Wang X, Dai J. Concise review: isoforms of OCT4 contribute to the confusing diversity in stem cell biology. *Stem Cells.* 2010 May;28(5):885-93.
224. Wang TT, Tio M, Lee W, Beerheide W, Udolph G. Neural differentiation of mesenchymal-like stem cells from cord blood is mediated by PKA. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Jun 15;357(4):1021-7.
225. Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 May 1;90(9):4304-8.
226. Ward JP. Oxygen sensors in context. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Jan;1777(1):1-14.
227. Weimann JM, Charlton CA, Brazelton TR, Hackman RC, Blau HM. Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Feb 18;100(4):2088-93.

228. Weng JY, Du X, Geng SX, Peng YW, Wang Z, Lu ZS, Wu SJ, Luo CW, Guo R, Ling W, Deng CX, Liao PJ, Xiang AP. Mesenchymal stem cell as salvage treatment for refractory chronic GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2010 Dec;45(12):1732-40.
229. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol.* 2003 Apr;121(2):368-74.
230. Wislet-Gendebien S, Hans G, Leprince P, Rigo JM, Moonen G, Rogister B. Plasticity of cultured mesenchymal stem cells: switch from nestin-positive to excitable neuron-like phenotype. *Stem Cells.* 2005 Mar;23(3):392-402.
231. Wislet-Gendebien S, Laudet E, Neirinckx V, Alix P, Leprince P, Glejzer A, Poulet C, Hennuy B, Sommer L, Shakhova O, Rogister B. Mesenchymal stem cells and neural crest stem cells from adult bone marrow: characterization of their surprising similarities and differences. *Cell Mol Life Sci.* 2012 Aug;69(15):2593-608.
232. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 2000 Aug 15;61(4):364-70.
233. Wu XB, Tao R. Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2012 Aug 15;11(4):360-71.
234. Xu WT, Bian ZY, Fan QM, Li G, Tang TT. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis. *Cancer Lett.* 2009 Aug 18;281(1):32-41.
235. Yan M, Sun M, Zhou Y, Wang W, He Z, Tang D, Lu S, Wang X, Li S, Wang W, Li H. Conversion of human umbilical cord mesenchymal stem cells in Wharton's jelly to dopamine neurons mediated by the Lmx1a and neurturin in vitro: potential therapeutic application for Parkinson's disease in a rhesus monkey model. *PLoS One.* 2013 May 28;8(5):e64000.
236. Yang J, Tang Y, Liu H, Guo F, Ni J, Le W. Suppression of histone deacetylation promotes the differentiation of human pluripotent stem cells towards neural progenitor cells. *BMC Biol.* 2014 Nov 19;12(1):95.
237. Yang E, Liu N, Tang Y, Hu Y, Zhang P, Pan C, Dong S, Zhang Y, Tang Z. Generation of neurospheres from human adipose-derived stem cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015:743714.
238. Yen BM, Yen ML. Mesenchymal stem cells and cancer for better and for worse. *J Cancer Mol.* 2008 4:5-9.
239. Yin F, Guo L, Meng CY, Liu YJ, Lu RF, Li P, Zhou YB. Transplantation of mesenchymal stem cells exerts anti-apoptotic effects in adult rats after spinal cord ischemia-reperfusion injury. *Brain Res.* 2014 May 2;1561:1-10.
240. Ying C, Hu W, Cheng B, Zheng X, Li S. Neural differentiation of rat adipose-derived stem cells in vitro. *Cell Mol Neurobiol.* 2012 Nov;32(8):1255-63.
241. Yi BR, Choi KJ, Kim SU, Choi KC. Therapeutic potential of stem cells expressing suicide genes that selectively target human breast cancer cells: evidence that they exert tumoricidal effects via tumor tropism (review). *Int J Oncol.* 2012 Sep;41(3):798-804.
242. Yu DY, Cringle SJ. Retinal degeneration and local oxygen metabolism. *Exp Eye Res.* 2005 Jun;80(6):745-51.
243. Zagórska A, Dulak J. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim Pol.* 2004;51(3):563-85.

244. Zarogoulidis P, Darwiche K, Sakkas A, Yarmus L, Huang H, Li Q, Freitag L, Zarogoulidis K, Malecki M. Suicide Gene Therapy for Cancer - Current Strategies. *J Genet Syndr Gene Ther.* 2013 Aug 9;4. pii: 16849.
245. Zeddou M, Briquet A, Relic B, Josse C, Malaise MG, Gothot A, Lechanteur C, Beguin Y. The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood. *Cell Biol Int.* 2010 Jul;34(7):693-701.
246. Zhang L, Seitz LC, Abramczyk AM, Liu L, Chan C. cAMP initiates early phase neuron-like morphology changes and late phase neural differentiation in mesenchymal stem cells. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Mar;68(5):863-76.
247. Zhang L, Tan X, Dong C, Zou L, Zhao H, Zhang X, Tian M, Jin G. In vitro differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs), derived from Wharton's jelly, into choline acetyltransferase (ChAT)-positive cells. *Int J Dev Neurosci.* 2012 Oct;30(6):471-7.
248. Zhang W, Su X, Gao Y, Sun B, Yu Y, Wang X, Zhang F. Berberine protects mesenchymal stem cells against hypoxia-induced apoptosis in vitro. *Biol Pharm Bull.* 2009 Aug;32(8):1335-42.
249. Zhang X, Hirai M, Cantero S, Ciubotariu R, Dobrila L, Hirsh A, Igura K, Satoh H, Yokomi I, Nishimura T, Yamaguchi S, Yoshimura K, Rubinstein P, Takahashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem.* 2011 Apr;112(4):1206-18.
250. Zhao K, Lou R, Huang F, Peng Y, Jiang Z, Huang K, Wu X, Zhang Y, Fan Z, Zhou H, Liu C, Xiao Y, Sun J, Li Y, Xiang P, Liu Q. Immunomodulation effects of mesenchymal stromal cells on acute graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 Jan;21(1):97-104.
251. Zimmerlin L, Donnenberg AD, Rubin JP, Basse P, Landreneau RJ, Donnenberg VS. Regenerative therapy and cancer: in vitro and in vivo studies of the interaction between adipose-derived stem cells and breast cancer cells from clinical isolates. *Tissue Eng Part A.* 2011 Jan;17(1-2):93-106.
252. Zimmermann S, Voss M, Kaiser S, Kapp U, Waller CF, Martens UM. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia.* 2003 Jun;17(6):1146-9.

Tabela 1. Podsumowanie protokołów wykorzystywanych w różnicowaniu neuralnym MSC

Tabela 2. Klasyfikacja deacetylaz histonów

Tabela 3. Stężenie tlenu w różnych tkankach i narządach

Tabela 4. Skład mediów wykorzystywanych w protokole do różnicowania neuralnego MSC

Tabela 5. Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji RT

Tabela 6. Skład mieszaniny do reakcji Real-time PCR

Tabela 7. Lista starterów użytych w reakcji RT-PCR i reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym

Tabela 8. Lista starterów użytych reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym

Tabela 9. Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym

Tabela 10. Przeciwciała pierwszorzędowe używane w badaniach immunocytochemicznych

Tabela 11. Przeciwciała drugorzędowe wykorzystane w badaniach immunocytochemicznych

Tabela 12. Porównanie liczby komórek MSC uzyskiwanych wyjściowo (po pierwszej trypsynizacji) z różnych źródeł (Uśrednione liczby ze wszystkich izolacji).

Tabela 13. Charakterystyka cech fenotypowych komórek MSC podczas długoterminowej hodowli in vitro, WJ-MSC (n=6), BM-MSC (n=4)

Tabela 14. Analiza kinetyki proliferacji hodowli komórek WJ-MSC i BM-MSC

