

PATRYCJA OBTUŁOWICZ

**WŁAŚCIWOŚCI NACZYNIO- I NEURO-PROTEKCYJNE KOMÓREK
MEZENCHYMALNYCH ORAZ PROGENITORÓW ENDOTELIALNYCH
POCHODZĄCYCH Z GALARETY WHARTONA**

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

Promotor pomocniczy – **dr Anna Sarnowska**

PRACOWNIA BIOINŻYNIERII KOMÓREK MACIERZYSTYCH

INSTYTUT MEDYCyny DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ

IM. MIROSŁAWA MOSSAKOWSKIEGO

POLSKIEJ AKADEMII NAUK



Warszawa 2017

Dziękuję Pani Prof. dr hab. n. med Krystynie Domańskiej-Janik za umożliwienie mi wykonania pracy w Pracowni Bioinżynierii Komórek Macierzystych oraz opiekę merytoryczną, przekazanie mi swojej wiedzy i doświadczeń, okazaną mi pomoc oraz wyrozumiałość i cierpliwość.

Dziękuję również Pani dr Annie Sarnowskiej za nieocenione wsparcie, cenne uwagi i pomoc w trakcie realizacji badań.

Podziękowania również dla moich Kolegów i Koleżanek oraz wszystkich pracowników Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk za pomoc i stworzenie atmosfery, która sprawia, że każdy dzień pracy jest przyjemnością.

Wyniki umieszczone w niniejszej rozprawie doktorskiej częściowo opublikowano w pracy:

Obtulowicz P, Lech W, Strojek L, Sarnowska A, Domanska-Janik K. Induction of Endothelial Phenotype From Wharton's Jelly-Derived MSCs and Comparison of Their Vasoprotective and Neuroprotective Potential With Primary WJ-MSCs in CA1 Hippocampal Region Ex Vivo. **Cell Transplantation**. 2016;25(4):715-27. doi: 10.3727/096368915X690369.

Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej rozprawie doktorskiej były finansowane w ramach projektów naukowo badawczych: grantu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki nr 2011/01/B/NZ3/05401, grantu Strategmed finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju nr 1/234261/2/NCBR/2014 oraz dzięki wsparciu stypendialnemu ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego, Program Operacyjny Kapitał Ludzki w ramach realizacji projektu „Wsparcie przedsiębiorczości naukowców bio tech med poprzez stypendia, staże i szkolenia” (UDA POKL.08.02.01-14-041/09).



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚĆ.



BIO&TECHNOLOGY
innovations platform

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Spis treści

Wykaz skrótów	7
1. WSTĘP	11
1.1. Patofizjologia jednostki neuronaczyniowej w udarze niedokrwiennym mózgu	11
1.2. Endogenne procesy naprawcze występujące w obrębie jednostki neuronaczyniowej po udarze niedokrwiennym mózgu	17
1.3. Mezenchymalne komórki macierzyste i możliwości ich zastosowania w leczeniu niedokrwiennego udaru mózgu.....	25
1.3.1. Charakterystyka mezenchymalnych komórek macierzystych	25
1.3.2. Proponowane mechanizmy działania regeneracyjnego mezenchymalnych komórek macierzystych w mózgu.....	31
1.3.3. Optymalizacja efektywności komórek mezenchymalnych w terapii niedokrwienia mózgu ..	38
2. CELE PRACY	42
3. MATERIAŁ	44
3.1. Mezenchymalne komórki macierzyste	44
3.2. Zwierzęta doświadczalne.....	44
3.3. Grupy badane	45
4. METODY BADAŃ	46
4.1. Hodowla komórek WJ-MSC i BM-MSC	46
4.2. Różnicowanie WJ-MSC w kierunku komórek mezodermy (adipocyty, osteocyty, chondrocyty)	46
4.3. Różnicowanie WJ-MSC w kierunku endotelialnym	47
4.4. Obliczanie powierzchni komórek WJ-MSC i WJ-EPC	47
4.5. Charakterystyka wzrostu WJ-MSC i WJ-EPC.....	47
4.6. Analiza immunocytochemiczna markerów endotelialnych.....	48
4.7. Analiza cytometryczna markerów mezenchymalnych	49
4.8. Analiza ekspresji genów.....	49
4.9. Test wychwytu acetylowanych lipoprotein niskiej gęstości	51
4.10. Test tworzenia sieci (struktur) kapilaropodobnych na Matrigel	51
4.11. Stymulacja receptorów Toll-podobnych.....	52
4.12. Ocena właściwości parakrynych komórek WJ-MSC i WJ-EPC	52
4.13. Hodowla organotypowa skrawków hipokampa	52
4.14. Eksperymentalny model ischemicznego uszkodzenia skrawków hipokampa.....	53

4.15. Współhodowla organotypowych skrawków hipokampa z komórkami WJ-MSC i WJ-EPC.....	53
4.16. Ocena przeżywalności komórek piramidowych w regionie CA1 i CA2/3 hipokampa.....	53
4.17. Analiza immunohistochemiczna organotypowych skrawków hipokampa	54
4.18. Znakowanie WJ-MSC oraz WJ-EPC barwnikiem fluorescencyjnym CMFDA	54
4.19. Eksperymentalny model uszkodzenia mózgu	55
4.20. Przygotowanie trójwymiarowych rusztowań lizatu płytkowego z WJ-MSC i WJ-EPC	55
4.21. Transplantacja WJ-MSC lub WJ-EPC osadzonych na rusztowaniach z lizatu płytkowego do mózgu szczura	55
4.22. Pobieranie materiału do badań	56
4.23. Analiza immunohistochemiczna	56
4.24. Wizualizacja mikroskopowa.....	57
4.25. Analiza statystyczna	58
5. WYNIKI BADAŃ.....	59
5.1. Doświadczenia <i>in vitro</i>	59
5.1.1. Weryfikacja mezenchymalnego charakteru WJ-MSC	59
5.1.1.1. Ocena morfologii WJ-MSC	59
5.1.1.2. Analiza mezenchymalnych markerów powierzchniowych WJ-MSC.....	59
5.1.1.3. Ocena zdolności WJ-MSC do różnicowania w komórki mezodermalne (adipocyty, osteocyty, chondrocyty).....	60
5.1.2. Różnicowanie śródbłonkowe WJ-MSC.....	61
5.1.2.1. Wpływ różnicowania w kierunku śródbłonka na morfologię i tempo wzrostu WJ-MSC .	61
5.1.2.2. Cytometryczna analiza obecności markerów mezenchymalnych na powierzchni WJ-EPC	63
5.1.2.3. Porównanie ekspresji markerów śródbłonkowych w WJ-MSC i WJ-EPC.....	63
5.1.2.4. Ocena funkcjonalnego zróżnicowania WJ-EPC.....	65
5.1.3. Ocena właściwości parakrynych WJ-MSC i WJ-EPC po stymulacji receptorów Toll-podobnych.....	66
5.2. Doświadczenia <i>ex vivo</i>	69
5.2.1. Właściwości naczynioprotekcyjne WJ-MSC i WJ-EPC w organotypowej hodowli skrawków hipokampa	69
5.2.2. Właściwości neuroprotektoryjne WJ-MSC i WJ-EPC w organotypowej hodowli skrawków hipokampa	72
5.3. Doświadczenia <i>in vivo</i>	73
5.3.1. Ocena wpływu hodowli w trójwymiarowych szkieletach z lizatu płytkowego na morfologię WJ-MSC	73

5.3.2. Działanie naczynioprotekcyjne WJ-MSK i WJ-EPC po transplantacji do prążkowiec uszkodzonego przez ouabainę w mózgu szczura	74
5.3.3. Wpływ transplantacji WJ-MSK i WJ-EPC na tworzenie blizny gwałowej w prążkowiec szczura po uszkodzeniu mózgu ouabainą.....	77
5.3.4. Porównanie reakcji zapalnej po transplantacji WJ-MSK i WJ-EPC w prążkowiec szczura po uszkodzeniu mózgu ouabainą.....	79
5.3.5. Wpływ transplantowanych WJ-MSK i WJ-EPC na proliferację komórek w uszkodzonym ouabainą prążkowiec mózgu szczura	81
5.3.6. Ocena potencjału neuralnego transplantowanych do prążkowiec mózgu szczura WJ-MSK i WJ-EPC.....	83
5.3.7. Porównanie wielkości uszkodzenia wywołanego ouabainą po transplantacji WJ-EPC i WJ-MSK.....	86
6. Dyskusja	87
7. Podsumowanie wyników i wnioski.....	99
8. Streszczenie	102
9. Abstract.....	108
10. Bibliografia.....	111

- ACTB – β -aktyna (ang. *ACTin β*)
- ADSC – mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej (ang. Adipose Derived Stem Cells)
- AIF – czynnik indukujący apoptozę (ang. Apoptosis Inducing Factor)
- Ang-1/2 – angiopoetyna 1 lub 2 (ang. Angiopoietin 1/2)
- ANOVA - analiza wariancji (ang. Analysis of VAriance)
- Bax – białko z rodziny białek Bcl-2 (ang. Bcl-2-Associated X Protein)
- BBB – bariera krew-mózg (ang. Blood-Brain Barrier)
- Bcl-2 – białko antyapoptotyczne z rodziny białek Bcl-2 (ang. B-Cell Lymphoma 2)
- BDNF – neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. Brain Derived Neurotrophic Factor)
- bFGF –czynnik wzrostu fibroblastów (ang. Basic Fibroblast Growth Factor)
- BM-MSC – mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego (ang. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells)
- BMP-7 – białko morfogenetyczne kości 7 (ang. Bone morphogenetic protein 7)
- BrdU – BromodeoksyUrydyna (ang. BromodeoxyUridine)
- CA – róg Amona, warstwa neuronów piramidowych hipokampa (łac. Cornu Ammonis)
- cAMP – cykliczny adenzyno-3',5'-monofosforan (ang. Cyclic Adenosine MonoPhosphate)
- CCR2 – receptor 2 chemokin typu C-C (ang. chemokine (C-C motif) receptor 2))
- CFS – płyn mózgowo-rdzeniowy (ang. Cerebrospinal Fluid)
- CFU – jednostka tworząca kolonię (ang. Colony Forming Unit)
- CMFDA – fluorescencyjny znacznik komórkowy (ang. 5-ChloroMethyl-Fluorescein-DiAcetate)
- CNTF – rzęskowy czynnik neurotroficzny (ang. Ciliary Neurotrophic Factor)
- CPDs –skumulowana liczba podwojeń populacji (ang. Cumulative Population Doublings)
- CSD – szerząca się depolaryzacja kory mózgowej (ang. Cortical Spreading Depolarisation)
- CX3CR1 – receptor fraktalkiny (ang. CX3C chemokine receptor 1)
- CX43 – koneksyna 43 (ang. Connexin 43)
- CXCL – ligand chemokin typu C-X-C (ang. chemokine (C-X-C motif ligand)
- CXCR – receptor dla chemokin z rodziny CXC (ang. CXC chemokine receptor)
- DCX – doublekortyna, białko związane z układem mikrotubularnym neuronów w komórkach progenitorowych (ang. Doublecortin)
- DiI-Ac-LDL – acetylowana lipoproteina niskiej gęstości znakowana nadchloranem 1,1\'-dioctadecyl – 3,3,3\',3\'-tetrametyl-indokarbocyaniny (ang. Acetylated Low Density Lipoprotein, 1,1\'-dioctadecyl – 3,3,3\',3\'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate)
- DIV – dni w hodowli (ang. Days *In Vitro*)
- DMEM – pożywka hodowlana (ang. Dulbecco/Vogt Modified Eagle's Minimal Essential Medium)
- ECM – macierz zewnątrzkomórkowa (ang. Extracellular Matrix)
- eEPC – wczesne progenitory śródbłonkowe (ang. Early Endothelial Progenitors)
- EGF – nabłonkowy czynnik wzrostu (ang. Epidermal Growth Factor)
- EGM-2 – pożywka wzrostowa dla śródbłonka (ang. Endothelial Growth Medium 2)
- ENCAM – zarodkowa cząsteczka przylegania komórek nerwowych (ang. Embryonic Nerve Cell Adhesion Molecule)
- eNOS – śródbłonkowa syntaza tlenku azotu (ang. Endothelial Nitric-Oxide Synthase)

EPC – progenitory śródbłonkowe (ang. Endothelial Progenitor Cells)
FAK – kinaza płytek przylegania (ang. Focal Adhesion Kinase)
GalC – β -galaktozydaza galaktocerebrozydu (ang. Galactosylceramidase)
GAPDH – dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerynowego (ang. Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase)
G-CSF – Czynniki stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (ang. Granulocyte-Colony Stimulating Factor)
GDNF – czynnik wzrostu pochodzenia glejowego (ang. Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor)
GFAP – glejowe kwaśne białko włóknikowe (ang. Glial Fibrillary Acidic Protein)
GM-CSF – Czynniki stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor)
GSH – glutation (ang. Glutathione)
GSH-PX – peroksydaza glutationowa (ang. Glutathione Peroxidase)
HBEGF – czynnik wzrostowy wiążący heparynę (ang. Heparin-Binding EGF-like Growth Factor)
HGF – czynnik wzrostu hepatocytów (ang. Hepatocyte Growth Factor)
HIF-1 α – czynnik transkrypcyjny indukowany niedotlenieniem (ang. Hypoxia-Inducible Factor 1 α)
HLA – ludzki antygen leukocytarny (ang. Human Leukocyte Antigen)
HSPG – proteoglikan siarczanu heparanu (ang. Heparan Sulfate Proteoglycan)
HUCB-NSCs – neuralne komórki macierzyste pochodzące z krwi pępowinowej (ang. Umbilical Cord Blood-derived Neural Stem/Progenitor Cells)
HUVEC – ludzkie komórki śródbłonka żyły pępowinowej (ang. Human Umbilical Vein Endothelial Cells)
ICAM-1 – białka adhezji międzykomórkowej (ang. Intercellular Adhesion Molecules)
IDO – dioksygenaza 2,3-indoleaminy (ang. Indoleamine 2,3-dioxygenase,)
IFN γ – interferon γ (ang. interferon γ)
IGF-1 – insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (ang. Insulin-like Growth Factor 1)
IP – jodek propidyny (ang. Propidium Iodide)
ISCT – Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej (ang. International Society for Cellular Therapy)
IBMX – izobutylometyloksantyna (ang. 3-IsoButyl-1-MethylXanthine)
Ki67 – antygen jądrowy Ki-67 - marker proliferacji komórkowej (ang. antigen Ki-67)
LFA-1 – antygen typu 1 związany z funkcją limfocytów (ang. Lymphocyte Function-associated Antigen 1)
LP – lizat płytkowy (ang. Platelet Lysate)
LPS – lipopolisacharyd (ang. Lipopolysaccharide)
MAP2 – białko stabilizujące mikrotubule (ang. Microtubule Associated Protein 2)
MBECs – mysie komórki śródbłonkowe mózgu (ang. Mouse Brain Endothelial Cells)
MCAO – zamknięcie tętnicy środkowej mózgu (ang. Middle Cerebral Artery Occlusion)
MCP-1 – białko chemotaktyczne dla monocytów 1, inaczej CCL2 (ang. monocyte chemoattractant protein -1)
MMPs – metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. Matrix metalloproteinases)
MPT – nadprzepuszczalność mitochondriów (ang. Mitochondrial Permeability Transition)
MSC – mezenchymalne komórki macierzyste (ang. Mesenchymal Stem Cells)
MSCA-1 – antygen mezenchymalnych komórek macierzystych (ang. Mesenchymal Stem Cell Antigen)

MSCGM – pożywka wzrostowa dla mezenchymalnych komórek macierzystych (ang. Mesenchymal Stem Cell Growth Medium)

NF-200 – białko neurofilamentów o masie molekularnej 200kDa (ang. 200 kDa Neurofilament Protein)

NGF – czynnik wzrostu nerwów (ang. Nerve Growth Factor)

NGFR – receptor czynnika wzrostu nerwów (ang. Nerve Growth Factor Receptor)

NMDAR - receptor N-metylo-D-asparaginowy (ang. N-Methyl-D-Aspartate Receptor)

NOS – syntaza tlenku azotu (ang. Nitric Oxide Synthase)

NSC – neuralne komórki macierzyste (ang. Neural Stem Cells)

NTF3 – neurotrofina 3 (ang. Neurotrophin 3)

NVU – jednostka neuronaczyniowa (ang. Neurovascular Unit)

OCT4 – czynnik transkrypcyjny OCT4, kluczowy dla pluripotencjalności (ang. Octamer-Binding Transcription Factor 3)

OGD – model czasowego pozbawienia hodowli komórkowej lub organotypowej glukozy i tlenu (ang. Oxygen-Glucose Deprivation)

OHC - organotypowa hodowla skrawkowa z hipokampa szczura (ang. Organotypic Hippocampal Slice Culture)

OPC – prekursor oligodendrocytów (ang. Oligodendrocyte Precursor Cells)

OUA – ouabaina (ang. ouabain)

PAI-1 – inhibitor aktywatora plazminogenu (ang. Plasminogen Activator Inhibitor-1)

PAR4 – receptor aktywowany przez proteazy (ang. Proteinase-Activated Receptor 4)

PBS – roztwór soli fizjologicznej w buforze fosforanowym (ang. Phosphate Buffered Saline)

PDGF – płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. Platelet-Derived Growth Factor)

PDT – czas podwojenia populacji (ang. Population Doubling Time)

PECAM-1 – płytkowo-śródbłonkowe białko adhezyjne 1 (ang. Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1)

PEDF – czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego siatkówki (ang. Pigment Epithelium-Derived Factor)

PFA – paraformaldehyd (ang. Paraformaldehyde)

PLGF – łożyskowy czynnik wzrostu (ang. Placental Growth Factor)

Poli(I:C) – syntetyczny dwuniciowy RNA (dsRNA) (ang. Polyinosinic:polycytidylic acid)

RECA-1 – przeciwciało skierowane przeciwko szczerzemu śródbłonkowi (ang. Anti-Endothelial Cell Antibody)

RMS – donosowy strumień migracyjny (ang. Rostral Migratory Stream)

ROS – reaktywne formy tlenu (ang. Reactive Oxygen Species)

SCID – ciężki złożony niedobór odporności (ang. Severe Combined Immunodeficiency)

SDF-1 – zrębowy czynnik wzrostu (ang. Stromal Cell-Derived Factor 1)

SGZ – strefa podziarnista zakrętu zębatego hipokampa (ang. Subgranular Zone)

SOD – dysmutaza ponadtlenkowa (ang. SuperOxide Dismutase)

SOX2 – czynnik transkrypcyjny kluczowy dla pluripotencjalności (ang. SRY-related HMG-box)

SSEA – antygen komórek niezróżnicowanych (ang. Stage Specific Embryonic Antigen)

SVZ – strefa okołokomorowa (ang. Subventricular Zone)

TGF-β1 – transformujący czynnik wzrostu (ang. Transforming Growth Factor)

TIE-1/2 – tyrozynowo-kinazowy receptor angiopoetyny 1 lub 2 (ang. Tyrosine-Protein Kinase Receptor)

TLR3/4 – receptor Toll-podobny 3 lub 4 (ang. Toll-like Receptor 3/4)

TNF- α – czynnik martwicy nowotworów (ang. Tumor Necrosis Factor)

tPA – tkankowy aktywator plazminogenu (ang. Tissue Plasminogen Activator)

TSP-1 – trombospondyna 1 (ang. Thrombospondin 1)

uPA - urokinazowy aktywator plazminogenu (ang. Urokinase Plasminogen Activator)

VCAM-1 – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń (ang. Vascular Cell Adhesion Molecule 1)

VEGF – czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. Vascular Endothelial Growth Factor)

VEGFR-1/2 – receptor czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego 1 lub 2 (ang. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1/2)

VLA-4 – bardzo późny antygen-4, inaczej integryna $\alpha 4\beta 1$ (ang. Very Late Antigen-4)

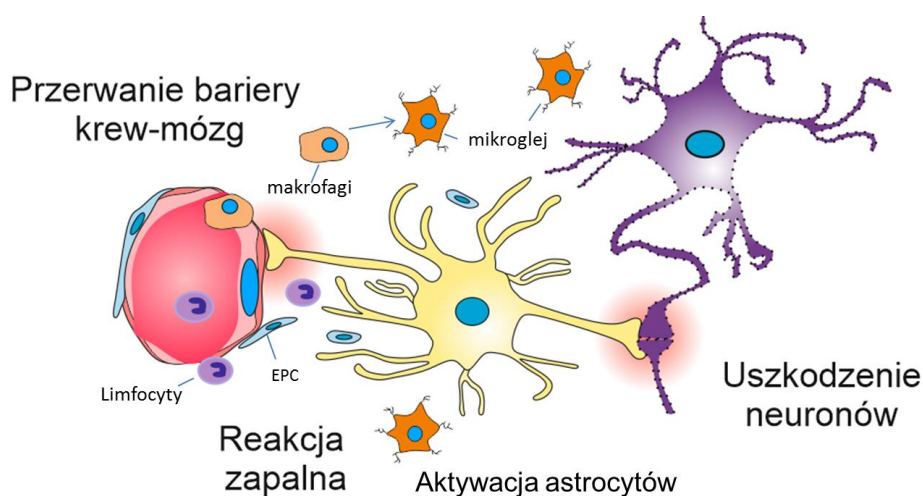
vWF – czynnik von Willebranda (ang. Von Willebrand Factor)

WJ-MSC – mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z galarety Whartona (ang. Whatron's Jelly Mezenchymal Stem Cells)

β -Tub III – β -tubulina III, białko mikrotubularne (ang. β -tubulin III)

1.1. Patofizjologia jednostki neuronaczyniowej w udarze niedokrwiennym mózgu

Niedokrwienny udar mózgu ma między innymi miejsce w schorzeniach naczyń prowadzących do zwężenia ich światła i niedostatecznego zaopatrzenia w krew poszczególnych obszarów mózgu. W większości przypadków wiąże się z zatorem tętnic proksymalnych (Strosznajder, 2005; Kanyal, 2015). Całokształt zmian patologicznych związanych z niedokrwieniem tkanki nerwowej określa się mianem triady naczynio-neuronalno-zapalnej. Zmiany zachodzące w wyniku udaru niedokrwiennego dotyczą wszystkich komponentów jednostki neuronaczyniowej (ang. Neurovascular Unit, NVU), w tym: komórek śródbłonki, perycytów, astrocytów, neuronów, mikrogleju i macierzy zewnątrzkomórkowej (del Zoppo, 2008) Ryc.1.



Ryc. 1. Schemat przedstawiający triadę naczynio-neuronalno-zapalną w niedokrwiennym udarze mózgu (schemat zmodyfikowany (Abeysinghe i in., 2016)).

Za patologię niedokrwienną odpowiada szereg procesów biochemicznych i pomimo licznych badań trudno jest jednoznacznie stwierdzić, który z nich zapoczątkowuje kaskadę zdarzeń prowadzącą do sukcesywnego obumierania wszystkich komponentów jednostki neuronaczyniowej. Do głównych procesów metabolicznych, zapoczątkowujących zmiany niedokrwienne w tkance, można zaliczyć: obniżenie parcjalnego stężenia O_2 , zaburzenia energetyczne prowadzące do depolaryzacji błon komórkowych, nadmierny wyrzut glutaminianu z zakończeń nerwowych oraz gwałtowne zwiększenie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} i mitochondrialnego poziomu wolnych rodników (ang. Reactive Oxygen Species, ROS). W wyniku zachodzących procesów dochodzi do zaburzeń homeostazy tkanki i nieodwracalnych zmian w funkcjonowaniu NVU (Strosznajder, 2005).

W wyniku niedokrwienia dochodzi do zahamowania transportu elektronów i fosforylacji oksydacyjnej w mitochondriach, skutkujące spadkiem poziomu stężenia ATP i fosfokreatyny, co następnie prowadzi do zahamowania Na^+/K^+ ATP-azy. Kilka minut po wystąpieniu udaru dochodzi do destabilizacji jonowej i nieprawidłowego napływu jonów Na^+ i wypływu jonów K^+ z komórek,

skutkującej depolaryzacją błon neuronów i komórek glejowych. Zwiększony napływ jonów Na^+ do neuronów, powoduje osmotyczny transport H_2O do wnętrza komórek, co wiąże się z obrzękiem cytotoxycznym, lizą komórek i nekrozą. W wyniku aktywacji glikolizy obniża się pH, zwiększa się stężenie wolnych rodników i ksantyny oraz dochodzi do zmian w fosforylacji szeregu enzymów i białek. Obserwuje się również czasowe zaburzenia wapniowej ATP-azy (Kanyal, 2015). Innym wczesnym zjawiskiem zachodzącym w niedokrwieniu mózgu jest zwiększenie stężenia poziomu wolnych nienasyconych kwasów tłuszczowych, w tym kwasu arachidonowego, który pod wpływem cyklooksygenazy i lipooksygenazy, przekształcany jest do prostaglandyn, prostacyklin i tromboksanów (tzw. eikozanoidy). W związku z niedokrwieniem dochodzi do zintensyfikowania transportu kwasu arachidonowego przez barierę krew-mózg (ang. Blood-Brain-Barrier, BBB) oraz do aktywacji peroksydacji kwasów tłuszczowych lipidów znajdujących się na błonach komórkowych. Wolne nienasycone kwasy tłuszczowe zmniejszają aktywność licznych enzymów i szlaków metabolicznych i zaburzają fosforylację oksydacyjną. Ponadto w wyniku peroksydacji przekształcają się w toksyczne aldehydy i ketony, które powodują uszkodzenie zakończeń nerwowych i zamieranie neuronów (Strosznajder, 2005). W wyniku zmian biochemicznych i zaburzeń jonowych dochodzi do wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu i azotu oraz wolnych kwasów tłuszczowych, pełniących funkcję naturalnych rozpręgaczy fosforylacji oksydacyjnej. Procesom tym towarzyszy zwiększona przepuszczalność błony mitochondriów (ang. Mitochondria Permeability Transition, MPT), która prowadzi do apoptozy lub krańcowo do nekrozy komórek (Kanyal, 2015; Strosznajder, 2005).

Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Na^+ prowadzi również do zmniejszenia wychwytu przez astrocyty glutaminianu, będącego głównym neuroprzekaźnikiem pobudzającym oraz zwiększonego jego uwalniania z zakończeń synaptycznych (Vidale, Consoli, Arnaboldi i Consoli, 2017). Warunki takie prowadzą do nadmiernej aktywacji receptorów glutaminianu AMPA i NMDA, a w konsekwencji do ekscytotoksyczności spowodowanej zbyt dużym napływem jonów Ca^{2+} oraz do aktywacji enzymów katabolicznych, uszkadzających składniki cytoszkieletu, błon komórkowych i DNA, jak również do zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu głównie w neuronach i w mniejszym stopniu w astrocytach. Depolaryzacja kolejnych neuronów (szczególnie piramidowych) zwiększa napływ jonów Ca^{2+} i produkcję glutaminianu, co jeszcze bardziej pogłębia skutki uszkodzenia (Vidale i in., 2017).

Niedrożność tętnicy przyczynia się do dalszej, dramatycznej redukcji ciśnienia parcjalego tlenu (pO_2) oraz zwiększenia ciśnienia parcjalego dwutlenku węgla (pCO_2). W przypadku ostrego epizodu niedokrwienego i w związku z hiperkapnią, pH tkanek może spaść nawet do 6,6. Anaerobowa glikoliza prowadzi do akumulacji kwasu mlekowego, co dodatkowo przyczynia się do śmierci komórkowej spowodowanej toksycznością zakwaszonego środowiska. Niskie pH stymuluje zwiększone wytwarzanie ROS i negatywnie wpływa na syntezę składników komórkowych, funkcje mitochondriów, kontrolę napływu H_2O do komórek i poniedokrwienny przepływ krwi. W wyniku uwalniania reaktywnych form tlenu i azotu, powstający rodnik ponadtlenkowy ($\text{O}_2^{\cdot-}$) reaguje z rodnikiem tlenku azotu (NO^{\cdot}) dając wysoce toksyczny i łatwo przechodzący przez błony komórkowe peroksyazotyn (NOOO^{\cdot}), którego degradacja prowadzi do uwolnienia kolejnych rodników: hydroksylowego (OH^{\cdot}) i dwutlenku azotu ($\text{NO}_2^{\cdot-}$). Rodniki te przyczyniają się do uszkodzenia nici DNA i do aktywacji polimerazy poli(ADP-rybozy) (PPARP), prowadząc do obumierania komórek na drodze apoptozy niezależnej od kaspaz. Kwasica, ROS, ATP uwolniony z obumierających tkanek i glutaminian w końcu prowadzą do uruchomienia nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, w tym do aktywacji

mikrogleju i krążących komórek układu odpornościowego (Strosznajder, 2005; Członkowska, Gromadzka i Członkowski, 2005).

Stopień uszkodzenia mózgu w niedokrwieniu, zależy w głównej mierze od czasu trwania niedokrwienia oraz wielkości i stopnia niedrożności naczynia krwionośnego zaopatrującego określony obszar mózgu. Szczególnie wrażliwymi na zmniejszenie przepływu krwi są neurony piramidowe w regionie CA1 hipokampa, komórki Purkinjego mózdzku, neurony prążkowiec oraz neurony II i IV warstwy kory mózgowej (Strosznajder, 2005). Nieprawidłowości w ich funkcjonowaniu, jak również zaburzenia czynników środowiskowych wywołują negatywne zmiany w działaniu powiązanych z nimi komórkach gleju, a następnie w składnikach strukturalnych i komórkowych naczyń krwionośnych, wpływając na ich przepuszczalność i skład macierzy zewnątrzkomórkowej (del Zoppo, Moskowitz i Nedergaard, 2016). Stopień uszkodzenia neuronów wiąże się zarówno z ich rodzajem (tzw. selektywna wrażliwość) jak i z bliskością naczyń krwionośnych. Im neurony są bardziej oddalone od najbliższego naczynia krwionośnego tym bardziej są narażone na skutki obniżonego drenażu (zjawisko tzw. „ostatniej łąki”) (Gonzales, Lin i Chesselet, 1992; Mabuchi i in., 2005).

Główne zmiany zachodzące w początkowej fazie niedokrwienia w obrębie naczyń krwionośnych można podzielić na trzy grupy:

1) związane ze zwiększoną przepuszczalnością ścian naczyń, spowodowaną uszkodzeniem śródbłonnków, degradacją macierzy zewnątrzkomórkowej i błony podstawnej oraz zerwaniem połączeń pomiędzy śródbłonkiem a komórkami astrocytów. Skutkuje to miejscowym przesiękiem, obrzmieniem i zapoczątkowuje transformację metaboliczną komórek mózgu;

2) zmiany związane z reakcją zapalną prowadzące do lokalnego zwężenia światła włóscinek, początkowego przylegania leukocytów do ścianek naczyń, a następnie ich transmigracji do otaczającej tkanki. W wyniku tych zdarzeń dochodzi do wtórnego zamknięcia światła naczyń krwionośnych na większym obszarze i aktywacji komórkowej odpowiedzi prozapalnej (del Zoppo i Hamann, 2011; del Zoppo, 2009);

3) związane z zaburzeniem hemostazy wewnątrznacyniowej prowadzącej do agregacji płytek i wytrącania włókien fibrynowych, co w efekcie prowadzi do pogłębienia zwężenia światła naczyń krwionośnych, zakrzepicy i dalszego zwiększenia przepuszczalności ścian (del Zoppo, Moskowitz i Nedergaard, 2016). Pomimo że zdarzenia te dotyczą głównie naczyń krwionośnych, to mają one swoje reperkusje w innych elementach jednostki neuronaczyniowej.

Na barierę krew-mózg składają się komórki śródbłonka z połączeniami ścisłymi i błoną podstawną, będącą przedłużeniem macierzy zewnątrzkomórkowej oraz zakończenia wypustek astrocytów. Powyższe komponenty łączą się ze sobą za pośrednictwem integryn. Bariera krew-mózg z jednej strony chroni neurony przed potencjalnie toksycznymi proteazami pochodzącymi z osocza, a z drugiej zapewnia im transport składników odżywczych. Nieprawidłowości w funkcjonowaniu bariery krew-mózg następują już po 30 minutach od wystąpienia niedrożności naczynia krwionośnego i w zależności od skali niedokrwienia mogą być czasowe lub trwałe. Jak już wspomniano, wiążą się one ze zmianami ultrastruktury śródbłonka i astrocytów w obrębie włóscinek, prowadząc do przeciekania płynu do przestrzeni okołonaczyniowej, a w konsekwencji do obrzęku (Naganuma, 1990; Okumura i in., 1997). Utrata funkcjonalności bariery krew-mózg

i zwiększenie jej przepuszczalności jest zjawiskiem wieloczynnikowym i może się łączyć z działaniem kinin (Aschner, Lum, Fletcher i Malik, 1997), czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (VEGF) (Suarez i Ballmer-Hofer, 2001), trombiny (Kubo i in., 2000), aktywacją metaloproteinaz (MMPs) (Heo i in., 1999), proteaz cysteinowych (Fukuda i in., 2004) oraz proteaz wydzielanych przez aktywowane leukocyty (Armao i in., 1997). W czasie niedokrwienia dochodzi do lokalnego zahamowania ekspresji i syntezy głównych komponentów macierzy zewnątrzkomórkowej błony podstawnej: lamininy-1, lamininy-5, kolagenu IV i fibronektyny, a dodatkowo obserwuje się zewnątrzkomórkową akumulację hemoglobiny, co może być następstwem miejscowych wynaczynień krwi (Hamann, Okada i del Zoppo, 1996). W związku ze zwiększeniem przepuszczalności naczyń krwionośnych pojawiają się zmiany w ekspresji integryny $\beta 1$ w obrębie uszkodzonego śródbłonka włóścików (Osada i in., 2011; Milner i in., 2008a) oraz ekspresja $\alpha\beta$ -dystroglikanu na zakończeniach astrocytarnych, biorących udział w transbłonowych wiązaniach komórek z macierzą zewnątrzkomórkową (Milner i in., 2008b). Koreluje to z zerwaniem połączeń między błoną podstawną naczyń, śródbłonkami a wypustkami astrocytów, co skutkuje zwiększonym napływem płynów (Hawkins, Gu, Izawa i Del Zoppo, 2013). Wyszczególniona kaskada zdarzeń ma miejsce w pierwszych godzinach od wystąpienia udaru niedokrwiennego (del Zoppo, Moskowitz i Nedergaard, 2016).

Odpowiedź zapalna jest inicjowana bezpośrednio po wystąpieniu zatoru i angażuje wszystkie elementy strukturalne jednostki neuronaczyniowej (del Zoppo, Moskowitz i Nedergaard, 2016). W wyniku nadprodukcji ROS i podwyższenia gotowości zakrzepowej, obejmującej aktywację dopełniacza, płytek krwi i komórek śródbłonka, dochodzi do sekrecji chemokin i cytokin prozapalnych. Pierwszymi cytokinami biorącymi udział w odpowiedzi na niedokrwienie są interleukina 1β (IL- 1β) (wydzielana przez pobudzone komórki śródbłonka, astrocyty, mikroglej, neurony i komórki tuczne) oraz czynnik martwicy nowotworów (TNF- α) (wydzielany przez makrofagi, monocyty, astrocyty, mikroglej i komórki tuczne) (Thompson, Thomas i Metcalfe, 1993).

Zaktywowane przez TNF- α i IL- 1β komórki śródbłonka zwiększają wydzielanie cząsteczek przylegania m. in. P-selektyn (magazynowanych w ciałkach Weibel-Palade), ICAM-1 (ang. Intercellular Adhesion Molecules; białka adhezji międzykomórkowej), VCAM-1 (ang. Vascular Cell Adhesion Molecule 1; cząsteczka adhezji komórkowej naczyń), PECAM-1 (ang. Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1; płytkowo-śródbłonkowe białko adhezyjne 1) i z pewnym opóźnieniem E-selektyn, umożliwiających stabilne wiązanie i przyleganie leukocytów (Członkowska, Gromadzka i Członkowski, 2005).

Już w ciągu pierwszej godziny od wystąpienia niedokrwienia, dzięki oddziaływaniom z cząsteczkami przylegania, dochodzi do przechodzenia leukocytów przez naczynie krwionośne do miejsca uszkodzenia (Abumiya i in., 1999). Dodatkowo, w związku ze zwiększoną produkcją wolnych rodników i prostanoidów, zwiększa się aktywność cyklooksygenazy-2 w komórkach odpornościowych i neuronach, co prowadzi do dalszych zmian degeneracyjnych. Cytokiny IL- 1β i TNF- α wpływają na zmniejszenie ekspresji śródbłonkowego receptora lamininy - integryny $\alpha_6\beta_1$, biorącego udział w dojrzewaniu progenitorowych komórek śródbłonka (Defilippi, Silengo i Tarone, 1992; Toya i in., 2015). Wydarzenia te, razem ze zmianami struktury i funkcji połączeń ścisłych śródbłonka, przyczyniają się do pogłębiania obrzęku.

W wyniku zwiększającej się przepuszczalności śródbłonka, dochodzi do agregacji płytek krwi, ekspresji okołonaczyniowego czynnika tkankowego i dalszej aktywacji kaskady krzepnięcia krwi i powstawania skrzepu. Proces ten prowadzi do wtórnego powiększenia się obszaru niedokrwienia w

obrębie najmniejszych naczyń krwionośnych, powodując tzw. „no-reflow phenomenon” (del Zoppo i Hamann, 2011). Ponadto w wyniku objętościowego efektu obrzęku komórkowego dochodzi do miejscowego zatrzymania mikrokrążenia i wzrostu ciśnienia śródczaszkowego. Co więcej, enzymy o aktywności proteolitycznej wydzielane w wyniku niedrożności naczynia krwionośnego mogą uczestniczyć w uszkodzeniu neuronów pośrednio lub bezpośrednio (Thornton, Pinteaux, Allan i Rothwell, 2008; del Zoppo, Moskowitz i Nedergaard, 2016). We wczesnej fazie reakcji zapalnej udział bierze również mikroglej. W warunkach patologicznych, komórki mikrogleju przechodzą w stan aktywny i poza produkcją TNF- α i IL-1 β regulują aktywność limfocytów T i ekspresjonują MMP-9. Neurony są również zdolne do reakcji na gwałtownie produkowane w wyniku niedokrwienia cytokiny, jednak sposób w jaki IL-1 β i TNF- α pośredniczą w transmisji tego sygnału jest wciąż przedmiotem badań wielu ośrodków (Aloisi, 2001).

Zmiany w integralności macierzy zewnątrzkomórkowej, błony podstawnej śródbłonna i w ekspresji receptorów przylegania, występują równocześnie z aktywacją i uwalnianiem do przestrzeni zewnątrzkomórkowych szeregu enzymów katabolicznych. Proteazy uczestniczące w degradacji macierzy zewnątrzkomórkowej wydzielane są bezpośrednio po niedokrwieniu i należą do trzech wyróżnianych rodzin: metaloproteinaz (MMP-2, MMP-9 i ich aktywatory), proteaz serynowych (urokinazowy aktywator plazminogenu, u-PA), proteaz cysteinowych (katepsyna L). Wszystkie wymienione proteazy pojawiają się w przestrzeni zewnątrzkomórkowej w przedziale 1-2 godzin od wystąpienia niedokrwienia (del Zoppo, Moskowitz i Nedergaard, 2016). Część produktów degradacji białek macierzy, posiada równocześnie właściwości cytokin/chemokin. Elastaza uwolniona w wyniku degranulacji leukocytów, tnie lamininę-5 do peptydów o właściwościach chemotaktycznych (Mydel i in., 2008). Podobnie dzieje się w przypadku cięcia kolagenu przez pochodzącą z leukocytów MMP-8 (Lin i in., 2008). W wyniku cięcia perlekanu przez katepsynę L powstają peptydy o działaniu pro-angiogennym (Lee i in., 2011), natomiast w wyniku degradacji kolagenu IV generowane są peptydy o właściwościach anty-angiogennych (Marnaros i Olsen, 2001). Komórkami biorącymi udział w sekrecji metaloproteinaz są również leukocyty wydzielające MMP-8 i MMP-9, perycyty produkujące (pro-)MMP-9 i monocyty/makrofagi odpowiedzialne za wytwarzanie (pro-)MMP-9 (Zozulya, Weidenfeller i Galla, 2008).

Uważa się, że astrocyty w wyniku niedokrwienia mogą zmienić swój fenotyp na „cytotroficzny” bądź „cytotoksyczny”. W pierwszym przypadku pełnią rolę ochronną dla neuronów poprzez zwiększenie wychwytu glutaminianu, przekazywanie glikogenu, inaktywację wolnych rodników dzięki zwiększonej ilości wewnątrzkomórkowych przeciwutleniaczy i produkcję szeregu neurotrofin. W drugim przypadku wykazują cechy neurotoksyczne związane z obniżeniem aktywności transporterów glutaminianu prowadząc do jego nagromadzenia w szczelinie synaptycznej i do zjawiska ekscytotoksyczności (Abeyasinghe i in., 2016). Astrocyty jako komórki aktywne immunologicznie są zdolne do prezentacji antygenów, posiadają właściwości fagocytarne i wydzielają prekursor metaloproteinazy-2 (pro-MMP-2), biorącej udział w degradacji błony podstawnej naczyń krwionośnych oraz wydzielają liczne cytokiny i chemokiny prozapalne w odpowiedzi na niedokrwienie (Dong i Benveniste, 2001). Część astrocytów w obrębie uszkodzonej tkanki ulega przerostowi, a ich wypustki zanikają (klazmatodendroza) (Członkowska, Gromadzka i Członkowski, 2005). Dochodzi do zwiększenia ekspresji kwaśnego białka glejowego (ang. Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP) i Rho GTP-azy prowadzące do zmian w cytoszkieletcie i w konsekwencji do oderwania zakończeń astrocytarnych od naczyń krwionośnych i neuronów. Dochodzi do powstania blizny

glejowej hamującej odbudowanie neuralnych połączeń, zarówno fizycznie jak i poprzez produkcję czynników inhibicyjnych, takich jak: proteoglikan siarczanu chondroityny, efryny, sematoforyny i białka slit (Abeysinghe i in., 2016).

Poza niedokrwieniem, również uszkodzenie mechaniczne i stres metaboliczny w podobny sposób zaburzają funkcjonowanie jednostek neuronaczyniowych, zależnych, jak opisano powyżej, od sprzężenia naczyniowo-nerwowego i integralności bariery krew-mózg. Zmianom w obrębie sieci neuronaczyniowej towarzyszy rozprzestrzeniająca się w mózgu tzw. depresja korowa (ang. Cortical Spreading Depolarisation, CSD), która obejmuje powolną i sukcesywnie rozchodzącą się falę depolaryzacji błon komórkowych neuronów i astrocytów, wynikająca z zaburzonej energozależnej równowagi jonowej. Dochodzi do napływu jonów Ca^{2+} , Cl^- Na^+ oraz H_2O i wypływu jonów K^+ i H^+ (Dreier, 2011; Somjen, 2001). Prowadzi to do zwiększonego zapotrzebowania na substraty energetyczne, dramatycznie większej konsumpcji tlenu i glukozy oraz dalszej redukcji ciśnienia parcjalnego tlenu i zwiększenia ciśnienia parcjalnego dwutlenku węgla w kolejnych obszarach mózgu (Strosznajder, 2005).

Po kilku dniach od niedokrwienia, wokół ogniska martwicy, można zaobserwować pierwsze oznaki miejscowej reakcji naprawczej np. powstawanie nowych naczyń włosowatych, przez które będą usuwane powstające produkty rozpadu martwiczej tkanki. W tym czasie dochodzi do zmiany fenotypu mikrogleju z M1 (prozapalnego) do M2 (antyzapalnego), który zaczyna wydzielać cytokiny IL-10 i IL-13 hamujące syntezę prozapalnych cytokin IL-1 β i TNF- α (Członkowska, Gromadzka i Członkowski, 2005). Do komórek wydzielających IL-10 dołączają limfocyty T i monocyty, co dodatkowo hamuje ekspresję cząsteczek przylegania ICAM-1 i VCAM oraz prozapalnych cytokin IL-6 i IL-8 (Tedgui i Mallat, 2001). Po około 2 dniach od epizodu niedokrwienego, stwierdza się aktywację gleju gwiaździstego, skutkującą przerostem i proliferacją tych komórek (Członkowska, Gromadzka i Członkowski, 2005). Początkowo działająca prozapalnie IL-6 (należąca do tzw. cytokin „mixed function”) na skutek zachodzących zmian środowiska po kilku dniach wykazuje działanie przeciwzapalne. Co więcej, IL-6 może zmniejszać uszkodzenie neuronów związane z nadmiernym pobudzeniem receptorów NMDA przez rosnące stężenie glutaminianu i tym samym przeciwdziałać tzw. opóźnionej, ekscytotoksycznej śmierci neuronów (Clark, 1997). W późniejszym czasie wydzielany jest również działający przeciwzapalnie transformujący czynnik wzrostu beta (ang. Transforming Growth Factor, TGF- β 1), który hamuje produkcję TNF- α przez mikroglej wraz z produkcją cytotoksycznego NO i wolnych rodników, przez makrofagi oraz wpływa na obniżenie zewnątrzkomórkowej ekspresji metaloproteinaz. Do przeciwzapalnego działania przyczynia się również wydzielanie IL-4, hamującej produkcję cytokin prozapalnych przez makrofagi oraz fagocytozę komórek mikrogleju (Tedgui i Mallat, 2001).

Podsumowując, pierwotną przyczyną uszkodzenia niedokrwienego jest hipoperfuzja mózgu, w wyniku której dramatycznie obniża się lokalna dostępność glukozy i tlenu. Dalsza kaskada reakcji związanych z niedokrwieniem, w skali histologicznej, może być rozpatrywana na poziomie tzw. jednostki neuronaczyniowej. Koncepcja ta umożliwi szersze zrozumienie i całościowy opis skomplikowanych procesów zachodzących w patologii poudarowej mózgu.

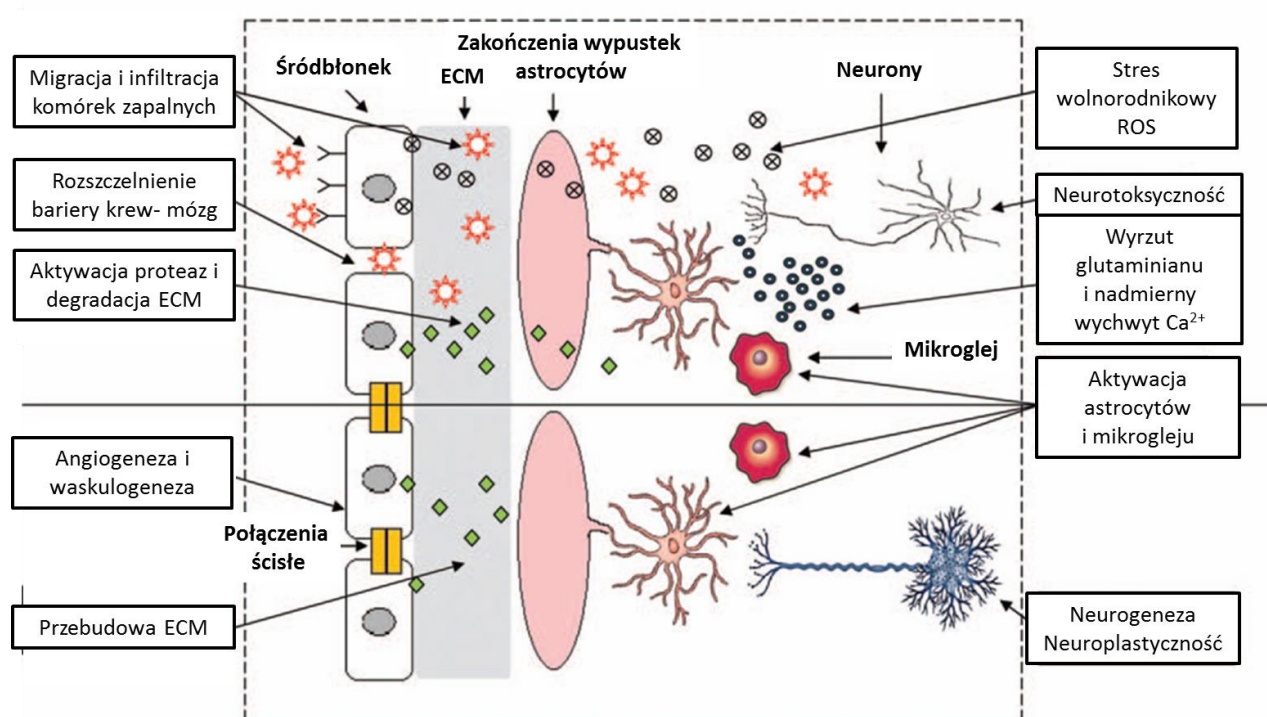
1.2. Endogenne procesy naprawcze występujące w obrębie uszkodzonej jednostki neuronaczyniowej

W dorosłym organizmie człowieka, niewielki stopień spoczynkowej neurogenezy można zaobserwować w strefie okołokomorowej (ang. Subventricular Zone, SVZ) mózgu, z której nowo powstałe neurony wędrują donosowym strumieniem migracyjnym (ang. Rostral Migratory Stream, RMS) do opuszki węchowej. Drugim obszarem neurogenetycznym jest strefa podziarnista zakrętu zębatego hipokampa (ang. Subgranular Zone, SGZ) (Ming i Song, 2011). Wykazano, że migrujące neuroblasty wędrują ścieżkami okołonaczyniowymi (ang. perivascular pathways) wzdłuż naczyń krwionośnych, a aktywna stymulacja neurogenezy połączona jest z równoległym zwiększeniem angiogenezy i odwrotnie (Xing i in., 2012). Palmer i wsp. (2000) dowodzą, że proces neurogenezy jest kontrolowany przez czynniki pochodzenia naczyniowego i ich mikrośrodowiska. W doświadczeniach *in vitro* wykazano, że we współhodowli neuroblastów z komórkami śródbłonna dochodzi do stymulacji neurogenezy (Shen i in., 2004). W wyniku uszkodzenia ischemicznego zaobserwowano również intensyfikację obu tych procesów, neurogenezy i angiogenezy, występujących *in vivo* (Sawada, Matsumoto i Sawamoto, 2014) (Ryc.2.).

W badaniach Bell i wsp. (2010) zaobserwowano, że uszczelnienie bariery krew-mózg obejmuje również ponowne ustanowienie prawidłowej funkcji jej komponenty glicylo-naczyniowej, w tym astrocytów i perycytów (Bell i in., 2010). W czasie przebudowy uszkodzonej tkanki nerwowej, astrocyty wydzielają trombospondynę 1 (ang. Trombospondin 1, TSP-1), która jest głównym regulatorem dojrzewania synaptycznego. Reaktywne astrocyty natomiast, wydzielają tkankowy aktywator plazminogenu (ang. Tissue Plasminogen Activator, tPA), biorący udział w regeneracji i przebudowie dendrytów, a tym samym połączeń synaptycznych. Skoordynowane interakcje między neuronami, astrocytami i śródbłonkiem leżą u podstaw efektywnej regeneracji uszkodzonego mózgu. Powszechnie wiadomo, że nadmierna aktywacja receptorów NMDA prowadzi do tzw. ekscytotoksycznej śmierci komórek w obrębie NVU. Mimo to, w późnej fazie uszkodzenia, aktywacja tych receptorów, prawdopodobnie razem z aktywacją przeżywalności sygnałów związanych z białkiem CREB (ang. cAMP response element – binding protein), jest niezbędna do przywrócenia plastyczności i odbudowy sieci neuronalnej. W ostatnich badaniach sugeruje się również, że migracja neuroblastów wzdłuż RMS jest zależna od interakcji wydzielanego przez nie glutamianu z receptorami NMDA znajdującymi się na astrocytach (Platel i in., 2010). Co więcej, wykazano że reaktywne astrocyty powstające w odpowiedzi na uszkodzenie tkanki, są również zdolne do wydzielania NGF (ang. Nerve Growth Factor, czynnik wzrostu nerwów), bFGF (ang. Basic Fibroblast Growth Factor, czynnik wzrostu fibroblastów), PDGF (ang. Platelet-Derived Growth Factor, płytkopochodny czynnik wzrostu), BDNF (ang. Brain Derived Neurotrophic Factor, neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego), CNTF (ang. Ciliary Neurotrophic Factor, rzęskowy czynnik neurotroficzny), neuropiliny, VEGF i innych czynników neuroprotektynnych i neurotroficznych biorących udział w zwiększeniu przeżywalności komórek, synaptogenezie, neurogenezie i angiogenezie (Xing i in., 2012). Mikroglej, pochodzący z linii monocytarnej, również bierze udział w lokalnych reakcjach immunologicznych mózgu. Część badaczy wysuwa hipotezę, według której istnieje, podobnie jak w przypadku makrofagów, reaktywny mikroglej typu M1 i M2, różniący się między sobą fenotypowo i funkcjonalnie. M1 wykazuje powszechnie znane właściwości prozapalne, natomiast M2 produkuje cytokiny przeciwzapalne i czynniki neurotroficzne, takie jak BDNF, bFGF,

IGF-1 (ang. Insulin-like Growth Factor 1, insulinopodobny czynnik wzrostu 1), TGF- β i VEGF (Narantuya i in., 2010). W warunkach fizjologicznych, mikroglej również pełni funkcje „opiekuńcze” uczestnicząc między innymi w przebudowie synaps, neurogenezie i tworzeniu naczyń krwionośnych.

Astrocyty, razem z komórkami śródbłonna, wydzielają liczne czynniki troficzne stymulujące m. in. tworzenie prekursorów oligodendrocytów (ang. Oligodendrocyte Precursor Cells, OPC). Co ciekawe, część badaczy uważa że poza niszą neuronacyniową, może istnieć również funkcjonalna nisza oligonacyniowa. Wykazano, że w wyniku niedokrwienia VEGF, pochodzący między innymi z astrocytów, stymuluje proliferację i migrację OPC. Oligodendrogenesa i angiogeneza są ze sobą połączone w skomplikowany i nie do końca jeszcze poznany sposób. Wiadomo jednak, że bez właściwej przebudowy istoty białej nie dochodzi do ponownego odtworzenia prawidłowych połączeń międzykomórkowych w naczyniach mózgu (Xing i in., 2012).

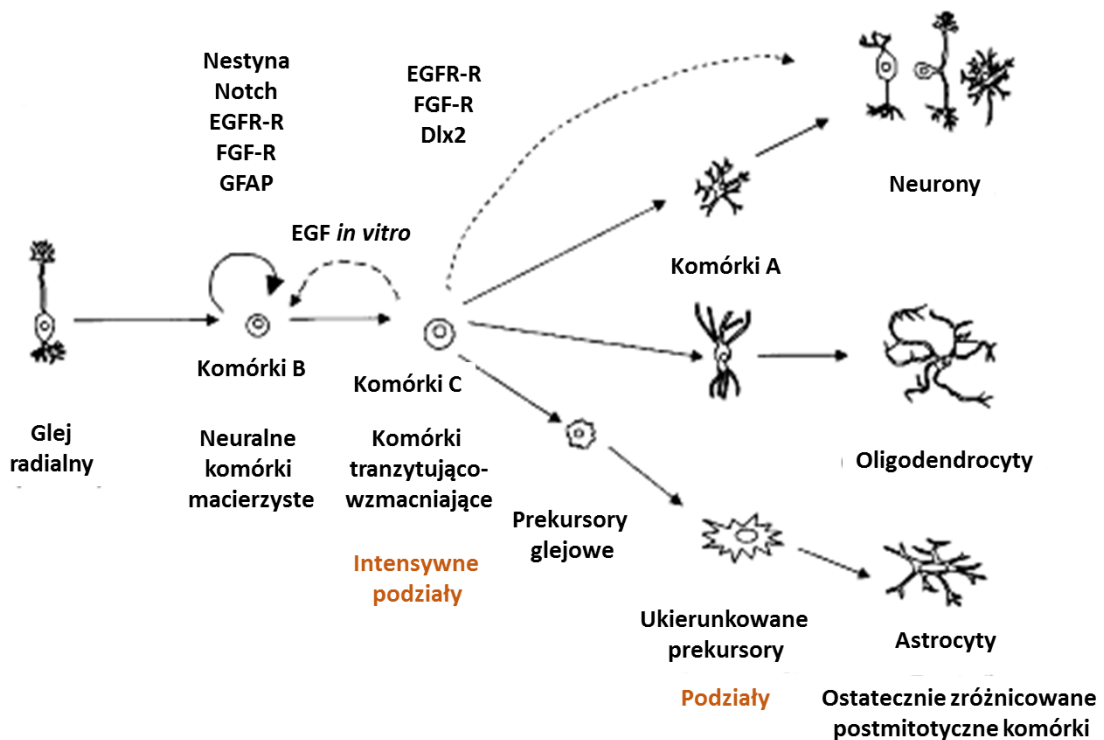


Ryc. 2. Schemat interakcji międzykomórkowych zaangażowanych w regenerację poniedokrwiennej jednostki neuronacyniowej (zmodyfikowany (Xing i in., 2012)).

Podstawą wieloetapowego i skomplikowanego procesu neurogenezy w mózgu są endogenne neuralne komórki macierzyste (ang. Neural Stem Cells, NSC), wykazujące zdolność do nielimitowanych podziałów mitotycznych oraz potencjał do różnicowania w neurony, astrocyty lub oligodendrocyty. Według części badaczy, w dojrzałym mózgu, poza omówionymi już strefami SVZ i SGZ, neuralne komórki macierzyste obserwuje się również w parenchymie mózgu, aczkolwiek występujące tam komórki cechują się niskim potencjałem proliferacyjnym (Gould, 2007; Bennett, Yang, Enikolopov i Iacovitti, 2009). Najaktywniejszym proliferacyjnie regionem neurogenym, stanowiącym główne źródło nowopowstałych neuronów również w sytuacjach patologicznych, jest strefa okołokomorowa SVZ.

W strefie tej wyróżnia się cztery typy komórek według Gage (2000): A - o charakterze neuronalnym, ekspresjonujące doublekortynę (ang. Neural Migration Protein Doublecortin, DCX) i GFAP, B - o charakterze neuralnym, ekspresjonujące m. in. GFAP i nestynę, C - szybko dzielące się progenitory neuralne oraz E - komórki o charakterze ependymocytów, ale również ekspresjonujące na nieznanym poziomie GFAP. W wyniku podziałów właściwych NSC (komórek typu B), powstają komórki typu C, przekształcające się w intensywnie proliferujące komórki typu A, czyli neuroblasty (Ryc. 3.). Te w postaci łańcuchów wędrują wzdłuż RMS do opuszki węchowej, gdzie różnicują się w interneurony, astrocyty, oligodendrocyty i komórki okołokłębuszkowe (Gage, 2000).

W strefie SGZ, nowe komórki tworzone są w warstwie podziarnistej, między warstwą ziarnistą a wnęką. Nisza neurogenna jest w tym miejscu silnie unaczyniona, a progenitory i komórki macierzyste lokalizują się w bezpośrednim sąsiedztwie kapilar, z których wydzielane są liczne czynniki stymulujące samoodnowę NSC i neurogenezę. W strefie SCZ można wyróżnić trzy typy komórek: I - tzw. spoczynkowe komórki progenitorowe, o charakterze glejowym, ekspresjonujące GFAP, nestynę i Sox2 (ang. (SRY (sex determining region Y)-box 2), II - silnie proliferujące tzw. przejściowo aktywowane komórki progenitorowe, ekspresjonujące nestynę oraz III/D - ekspresjonujące DCX i białka przylegania (ang. polysialylated neuronal cell adhesion molecule, PSA-NCAM), dzielące się na podklasę D2 i D3 - czyli neuroblasty. W procesie neurogenezy w SGZ proliferujące i migrujące komórki typu I, różnicują się w typ D2, a następnie w D3, czyli neuroblasty, które dojrzewają w warstwie ziarnistej (Ernst i Frisén, 2015; Gage, 2000).



Ryc. 3. Schemat przedstawiający neurogenezę w strefie SVZ (schemat zmieniony (Gage, 2000)).

Naczynia włosowate w strefie SVZ, w przeciwieństwie do większości naczyń krwionośnych w mózgu, nie są szczelnie otoczone perycytami i astrocytami, stając się częściowo przepuszczalnymi dla małocząsteczkowych związków pochodzących z krwi (Lacar i in., 2012). Istnieje szereg badań

wykazujących, że komórki naczyń krwionośnych, w tym perycyty mają cechy komórek macierzystych i są zdolne do generowania komórek neuralnych, a miejsca rozgałęzień naczyń krwionośnych tworzą odpowiednie środowisko (niszę) dla neurogenezy (Sawada, Matsumoto i Sawamoto, 2014). Ponadto wykazano, że u noworodków nowo utworzone neurony wędrują wzdłuż naczyń krwionośnych zarówno do opuszki węchowej, jak i do innych okolic kory mózgowej (Le Magueresse i in., 2012). U dorosłych natomiast potwierdzono, że neuroblasty powstające w SVZ wędrują wzdłuż naczyń krwionośnych donosowym strumieniem migracyjnym do opuszki węchowej (Sawada, Matsumoto i Sawamoto, 2014).

W badaniach na szczurzym modelu niedokrwienia mózgu wykazano, że nowopowstające w SVZ progenitory neuralne wędrują do miejsca uszkodzenia, gdzie różnicują w komórki dojrzałe. Jednak wyprzedzającą reakcją na niedokrwienie jest nie tylko wzmożenie migracji neuroblastów, ale również zwiększenie angiogenezy w miejscu uszkodzenia. W modelu MCAO (ang. Middle Cerebral Occlusion, model zamknięcia tętnicy środkowej mózgu) eskalacja angiogenezy w uszkodzonym prążkowie szczura trwa od kilku dni do kilku tygodni. W tym samym czasie obserwowano wzmożoną neurogenezę i powstanie nowych neuronów, oligodendrocytów i astrocytów w uszkodzonej półkuli mózgu (Benner i in., 2013). Wykazano, że nowopowstałe neurony migrują do miejsca uszkodzenia w formie łańcuchów migracyjnych wzdłuż naczyń krwionośnych (Saha i in., 2013). Ponadto w czasie migracji komórki progenitorowe wchodziły w funkcjonalne interakcje z astrocytami i śródbłonkiem naczyniowym. W badaniach Cayre i wsp. (2013) wykazano, że hamowanie poniedokrwiennej angiogenezy skutkuje zmniejszeniem liczby nowych neuronów zasiedlających miejsce uszkodzenia. Potwierdza to istotne znaczenie nowopowstających naczyń krwionośnych dla prawidłowego przebiegu neuroregeneracji (Cayre i in., 2013).

Lokalne zmiany przepływu krwi w strefie SVZ, wpływają na zmiany stężeń istotnych dla neurogenezy związków drobnocząsteczkowych, takich jak ATP, NO, glukoza i O₂, regulując proliferację macierzystych i progenitorowych komórek neuralnych (Sawada, Matsumoto i Sawamoto, 2014). Zmianie ulega również dynamika przesiekania płynów (ang. fluid dynamics), która w warunkach fizjologicznych reguluje bierny transport krwiopochodnych czynników przez ściany naczyń w strefie SVZ (Nishijima i in., 2010). Ostatnie badania wykazały, że płyn mózgowo-rdzeniowy (ang. Cerebrospinal Fluid, CSF) dzięki przestrzeniom otaczającym naczynia krwionośne kontaktuje się bezpośrednio z parenchymą mózgu. Płyn mózgowo-rdzeniowy zawiera liczne morfogeny i czynniki wzrostowe, takie jak: Slit i Sonic hedgehog (Shh), a niedokrwienie powoduje podniesienie poziomu Shh w CSF (Sirko i in., 2013).

Czynniki wzrostowe wydzielane przez komórki naczyniopochodne wchodzące w skład niszy neurogennej odgrywają, jak wiadomo, zasadniczą rolę w neurogeniezie. Czynniki pochodzący z nabłonka barwnikowego siatkówki (ang. Pigment Epithelium-Derived Factor, PEDF), wydzielany również przez komórki ependymalne i komórki śródbłonkowe naczyń krwionośnych w strefie SVZ, jest regulowany poprzez sygnał Notch, istotny dla utrzymania samoodnowy i multipotencji komórek NSC znajdujących się w niszy (Andreu-Agulló, Morante-Redolat, Delgado i Fariñas, 2009). Betacelulina należąca do rodziny nabłonkowych czynników wzrostu (ang. Epidermal Growth Factor, EGF) reguluje proliferację macierzystych i progenitorowych komórek neuralnych i nowych neuronów ekspresjonujące EGFR jak i ErbB4 (Gómez-Gaviro i in., 2012). VEGF i angiopoetyna 1 (Ang-1), będące silnymi czynnikami angiogennymi stymulują równocześnie proliferację neuralnych komórek

progenitorowych w SVZ (Rosa i in., 2010). Kolejnym czynnikiem stymulującym migrację nowopowstałych neuronów wzdłuż naczyń krwionośnych zarówno wzdłuż RMS jak i w kierunku uszkodzonego niedokrwienniem prążkowiec, jest BDNF (Grade i in., 2013). W badaniach Snapyan i wsp. wykazano, że astrocyty też odgrywają istotną rolę modulacyjną w migracji nowopowstałych neuronów, głównie poprzez regulację poziomu BDNF. Reaktywne astrocyty powstające w uszkodzonej tkance nerwowej są zdolne do wychwytu BDNF wydzielanego przez śródbłonek naczyń (Snapyan i in., 2009).

W wyniku niedokrwienia dochodzi do zwiększonej ekspresji licznych czynników mających działanie zarówno neurogenne jak i angiogenne, włączając w to VEGF, Ang-1 i Netrin-1 (Cayre i in., 2013). Hamowanie osi sygnałowej VEGF/VEGF-R2 tłumi indukowaną niedokrwienniem angiogenezę i neurogenezę. Wykazano, że egzogenne podanie VEGF stymuluje angiogenezę, proliferację progenitorów neuralnych w strefie SVZ i migrację nowych neuronów do miejsca uszkodzenia. Czynniki te zwiększa przeżywalność nowopowstałych neuronów, prowadząc do zmniejszenia niedokrwienych deficytów neurologicznych (Thau-Zuchman, Shohami, Alexandrovich i Leker, 2010). W innych badaniach potwierdzono, że VEGF może zwiększać proliferację, migrację i różnicowanie w strefie SVZ *in vitro* oraz wpływać stymulująco na lokalne wydzielanie BDNF (Sawada, Matsumoto i Sawamoto, 2014).

W warunkach fizjologicznych, zrębowy czynnik wzrostu 1 (ang. Stromal Cell-Derived Factor 1, SDF-1) wydzielany przez komórki wyściółki komórek, utrzymuje występujące tu neuralne komórki macierzyste w stanie spoczynku. Natomiast, jeżeli jest on wydzielany przez komórki śródbłonek naczyń, to „uśpione” NSC przechodzą w stan proliferacyjnie aktywny, dzięki czemu aktywowana jest cała nisza neurogenna SVZ (Kokovay i in., 2010).

W warunkach patologicznych, takich jak niedokrwienie, SDF-1 wydzielany jest nie tylko w niszy neurogennej przez komórki śródbłonek, ale również w miejscu uszkodzenia. Wtedy istotną rolę w migracji neuroblastów w kierunku ogniska niedokrwienia odgrywa tzw. oś SDF-1/CXCR4. Wykazano, że zablokowanie swoistego receptora dla SDF-1 CXCR4, hamuje migrację nowopowstałych neuronów *in vitro* i *in vivo* (Kojima i in., 2010).

Innymi chemokinami, których ekspresja wzrasta w wyniku niedokrwienia są cząsteczki o akronimach MCP-1, MIP- α , CXCL-1. W badaniach z wykorzystaniem szczurzego modelu MCAO wykazano, że MCP-1 indukuje różnicowanie progenitorów neuralnych w kierunku neuronalnym oraz stymuluje migrację nowych neuronów *in vitro* (Sawada, Matsumoto i Sawamoto, 2014). W kolejnym badaniu stwierdzono, że białko MCP-1 jest wydzielane przez reaktywne astrocyty i mikroglej, natomiast ich receptory CCR-2 są zlokalizowane na migrujących nowych neuronach. W doświadczeniach, w których wykorzystano myszy z wyciszonym genem MCP-1 lub CCR-2 zaobserwowano zahamowanie migracji neuronów do miejsca uszkodzenia, co sugeruje, że podobnie jak w przypadku osi SDF1-CXCR4 aktywacja ścieżki sygnałowej MCP-1/CCR-2 jest również niezbędna dla prawidłowej regeneracji (Yan i in., 2007).

Macierz zewnątrzkomórkowa otaczająca naczynia krwionośne w strefie SVZ jest tworzona przez naczyniowe komórki śródbłonek, perycyty, astrocyty oraz macierzyste i progenitorowe komórki neuralne. W ten sposób wzbogacone środowisko komórkowe tworzy pośrednio bądź bezpośrednio, odpowiednie warunki do neurogeny (Sawada, Matsumoto i Sawamoto, 2014). Wykazano, że jedna

z proteoglikanowych składowych błony podstawnej naczyń krwionośnych, siarczan heparanu (ang. heparan sulfate proteoglycan, HSPG), wywiera hamujący wpływ na proliferację komórek w SVZ poprzez wiązanie się z białkiem morfogenetycznym kości 7 (ang. Bone Morphogenetic Protein 7, BMP-7) (Douet, Arikawa-Hirasawa i Mercier, 2012). W kolejnych badaniach wykazano, że jest zdolny do oddziaływania również z innymi czynnikami jak np. inne izoformy BMP, Shh, Wnts, Slits, czy czynniki wzrostu, modulując znacząco ich aktywność biologiczną, regulując w ten sposób neurogenezę w SVZ (Sawada i Sawamoto, 2013). Inny komponent ściany naczyń krwionośnych - laminina również wpływa na relacje między naczyniami krwionośnymi a progenitorami komórek neuralnych ekspresjonującymi integrynę $\alpha 6 \beta 1$. Wykazano, że aktywacja szlaku SDF-1/CXCR4 prowadzi do zwiększenia wiązania lamininy z macierzystymi i progenitorowymi komórkami neuralnymi. W kolejnych badaniach wykazano, że w wyniku uszkodzenia niedokrwienego w SVZ dochodzi do wzrostu poziomu szeregu białek ECM i ich receptorów, w tym: tenascyny C, integryny αV i $\beta 3$, jednak ich rola w neurogeniezie nie została jeszcze poznana (Sawada, Matsumoto i Sawamoto, 2014).

Jak już wspomniano poprzednio, drugim procesem, poza neurogenezą, niezbędnym w regeneracji mózgu jest stymulacja angiogenezy, w czasie której z istniejących naczyń krwionośnych „kiełkują” (ang. sprouting) nowe mikronaczynia. U ludzi w wyniku udaru niedokrwienego mózgu już po 3-4 godzinach obserwuje się powstawanie nowych naczyń włosowatych. W badaniach pośmiertnych u ludzi wykazuje się zwiększoną gęstość naczyń krwionośnych w strefie półcienia (penumbry) w porównaniu do nieuszkodzonej półkuli kontralateralnej (Seto i in., 2016), a w modelach zwierzęcych (Hayashi, Noshita, Sugawara i Chan, 2003; Marti i in., 2000) potwierdzono występowanie angiogenezy w całym okresie regeneracyjnym. W innych badaniach wykazano, że podwyższona liczba naczyń krwionośnych koreluje ze zwiększoną przeżywalnością i mniejszymi poudarowymi deficytami neurologicznymi (Marti i in., 2000).

Jak wspomniano w podrozdziale 1.1., w udarze niedokrwienym mózgu dochodzi do rozszczelnienia bariery krew-mózg, obrzęku i indukcji zmian fenotypowych w astrocytach. Aktywowane astrocyty mają udział w zmianach macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. Extracellular Matrix, ECM) włączającej się w proces regeneracji poniedokrwiennej poprzez tworzenie tzw. ścieżek migracyjnych (ang. ECM tracts). Migrujące progenitory endotelialne wykorzystują te ścieżki do przemieszczania się w kierunku tworzących się *de novo* naczyń włosowatych wokół ogniska udarowego. Jest to niedawno poznany proces. ściśle kontrolowany przez interakcje pomiędzy czynnikami angiogennymi i angiostatycznymi (Fan i Yang, 2007). Wykazano podobieństwo tych dróg migracyjnych do ścieżek wykorzystywanych w migracji neuroblastów w mikro-przestrzeniach okołonaczyniowych (Alvarez-Buylla i Garcia-Verdugo, 2002).

Czynnikami biorącymi udział w angiogenezie są między innymi: VEGF, angiopoetyna, PDGF (ang. Platelet-Derived Growth Factor, płytkopochodny czynnik wzrostu), angiogenina, TGF, bFGF, MMP, tlenek azotu (NO) i prostaglandyna E2 (Talwar i Srivastava, 2014; Zhao i in., 2006). W badaniach Carmeliet (2000) wykazano, że w wyniku niedokrwienia i połączonego efektu NO i VEGF dochodzi do poszerzenia i rozszczelnienia naczyń krwionośnych, co prowadzi do wynacynienia białek osocza i stworzenia przez nie tymczasowych rusztowań ułatwiających migrację progenitorów śródbłonkowych (ang. Endothelial Progenitor Cells, EPC) i tworzenie nowych kapilar. W wyniku zachodzących zmian dochodzi do rozdzielenia się komórek mięśni gładkich, a macierz zewnątrzkomórkowa ulega rozluźnieniu. W procesach tych pośredniczą angiopoetyna 2 (Ang2)

i MMP (Carmeliet i Collen, 2000). MMP, początkowo pogłębiające uszkodzenie macierzy neuronaczyniowej, w późniejszej fazie niedokrwienia stymulują przebudowę neuronaczyniową i ułatwiają migrację neuroblastów do miejsca uszkodzenia (Xing i in., 2012). Dochodzi do ustalenia kierunku tworzenia nowego naczynia krwionośnego, a proliferacja i migracja progenitorów endotelialnych jest regulowana przez VEGF.

Powstałe naczynie krwionośne jest stabilizowane przez angiopoetynę 1 (Ang1), której ekspresja wzrasta w skutek niedokrwienia, poprzez aktywację receptora Tie2 (ang. Tyrosine-Protein Kinase Receptor 2, tyrozynowo kinazowy receptor angiopoetyny 2). W poniedokrwiennym procesie tworzenia nowych naczyń krwionośnych biorą też udział IL-1 α , IL-6 i TSP-1 (Chen i in., 2016). Wykazano, że TSP-1 po związaniu się z ze swoim receptorem CD36 kontroluje mitozę, migrację i apoptozę śródbłonna (Seto i in., 2016). W badaniach Gertz i wsp. (2012) wykazano, że IL-6 wydzielana przez endogenne komórki mózgu myszy stymulowała poniedokrwienną angiogenezę. Ponadto w przypadku wyciszenia u myszy genu kodującego IL-6 zaobserwowano zwiększenie uszkodzenia i mniejszą gęstość naczyń krwionośnych w wyniku niedokrwienia mózgu (Gertz i in., 2012).

W wyniku uszkodzenia niedokrwiennego mózgu w ciągu kilku godzin dochodzi do znacznego zwiększenia sekrecji VEGF, będącego jednym z najważniejszych czynników regulujących angiogenezę. Do rodziny VEGF zalicza się: łożyskowy czynnik wzrostu (ang. Placental Growth Factor, PLGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E i VEGF-F. Swoje działanie angiogenne zawdzięcza związaniu z receptorem kinazowo tyrozynowym VEGFR-1 lub VEGFR-2. Istnieje szereg czynników regulujących syntezę VEGF w różnych komórkach, ale najsilniejszym jest niedotlenienie, w wyniku którego dochodzi do aktywacji czynnika transkrypcyjnego indukowanego niedotlenieniem (ang. Hypoxia Inducible Factor, HIF-1 α) regulowanego przez STAT-1 i STAT-3 (Seto i in., 2016). Co ciekawe, pomimo że VEGF wykazuje większe powinowactwo do VEGFR-1, to efekty biologiczne jego działania są głównie związane z VEGFR-2. Uważa się, że VEGFR-1 może pełnić funkcję regulacyjną, wychwytyjąc nadmiar VEGF. Niemniej jednak w wyniku aktywacji receptora VEGFR-1 lub VEGFR-2 dochodzi do stymulacji proliferacji progenitorów śródbłonkowych, ich migracji oraz degradacji ECM i zwiększenia przepuszczalności naczyń krwionośnych, co ułatwia dotarcie do miejsca uszkodzenia. Głównymi ścieżkami sygnałowymi biorącymi udział w stymulacji angiogenezy za sprawą VEGF są PI3K/AKT i MEK/ERK (Beck i Plate, 2009). Innym czynnikiem wpływającym na zwiększenie wydzielania VEGF jest NO. Z jednej strony VEGF stymuluje komórki śródbłonna do wytwarzania NO, przez aktywację śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (ang. Endothelial Nitric-oxide Synthase, eNOS), z drugiej NO stymuluje wydzielanie VEGF przez komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych (Seto i in., 2016). W ostatnim czasie dużo badań jest poświęconych zagadnieniu roli miRNA w regulowaniu procesu angiogenezy. W szczurzym modelu MCAO zaobserwowano spadek miR-139 i miR-335 w komórkach śródbłonna. Zarówno miR-139 jak i miR-335 są blisko związane z procesem angiogenezy indukowanej niedokrwieniem przez ścieżki sygnałowe ROCK1 i ROCK2, które są znane jako regulatory VEGF (Liu i in., 2015; Qu i in., 2014). Wykazano również, że miR-104-5p może wpływać na zwiększenie ekspresji VEGF-A w komórkach śródbłonkowych po niedokrwieniu (Sun i in., 2016, s.). W innych badaniach wykazano, że po godzinie doszło do zwiększenia poziomu bFGF i stan ten trwał przez kolejne 14 dni. Czynnikiem ten prawdopodobnie bezpośrednio stymuluje angiogenezę poprzez uczestniczenie w migracji i proliferacji progenitorów śródbłonkowych oraz pośrednio wpływa na zwiększenie sekrecji VEGF przez komórki mięśni gładkich (Seto i in., 2016). Istotną rolę w proliferacji i „kietkowaniu” (ang.

sprouting) endogennych progenitorów endotelialnych tworzących nowe naczynia krwionośne przypisuje się również IGF, którego sekrecja jest również regulowana m.in. przez HIF-1 α (Liang i in., 2014). Poza początkową fazą wzrostu ilości metaloproteinazy 9 (MMP-9) uczestniczącej w zwiększeniu przepuszczalności bariery krew-mózg oraz tworzeniu obrzęku, zaobserwowano ponowne jej uwolnienie sugerując związek z procesem angiogenezy. Wykazano, że w wyniku hamowania ponownego wyrzutu metaloproteinazy 9 dochodzi do deformacji naczyń krwionośnych, zwiększenia uszkodzenia i pogłębienia deficytów neurologicznych związanych z niedokrwieniem (Zhao i in., 2006). W podobny sposób wydzielany jest TSP-1, w pierwszym etapie maksimum sekrecji obserwuje się po godzinie, a w drugim po 72 godzinach. Uważa się, że kolejna faza wydzielania TSP-1 wiąże się z zakończeniem procesu angiogenezy (Yin, Hamblin i Chen, 2015).

1.3. Mezenchymalne komórki macierzyste i możliwości ich zastosowania w leczeniu niedokrwiennego udaru mózgu

1.3.1. Charakterystyka mezenchymalnych komórek macierzystych

Mezenchymalne komórki macierzyste po raz pierwszy zostały opisane przez grupę badawczą Friedensteina w 1976 roku. Po kilku dniach inkubacji szpiku kostnego w plastikowym naczynku hodowlanym, zauważono heterogenną populację komórek przywierającą do podłoża. Komórki te, przypominające kształtem fibroblasty, tworzyły niewielkie kolonie otoczone przez inne komórki jednojądrzaste (mononuklearne). Uznano, że są to klonogenne komórki prekursorowe fibroblastów CFU-F (ang. Colony Forming Unit – Fibroblasts) oraz pełnią funkcję wspierania hematopoezy. W 1985 roku Owen zasugerował obecność w szpiku kostnym nisz z macierzystymi komórkami zrębu, mającymi zdolność do samoodnowy i do tworzenia „dojrzałych” komórek zrębu. Miały one produkować czynniki wzrostowe oraz białka macierzy zewnątrzkomórkowej i przez to wspomagać hematopoezę. Dopiero w późnych latach osiemdziesiątych dowiedziono, że komórki wyizolowane przez Friedensteina są w rzeczywistości multipotencjalnymi komórkami zdolnymi do różnicowania w osteoblasty, chondrocyty i adipocyty. W latach dziewięćdziesiątych Caplan uznał, że powyższe komórki w trakcie rozwoju embrionalnego wywodzą się z mezodermy i jako pierwszy użył terminu „mezenchymalne komórki macierzyste” (ang. Mesenchymal Stem Cells, MSC) (Mafi i in., 2011; Caplan, 1991), (Lindner, Kramer, Rohwedel i Schlenke, 2010a). „Klasyczne” mezenchymalne komórki macierzyste określane są jako niehematopoetyczne, multipotencjalne komórki zdolne do samoodnowy i różnicowania w szereg innych typów komórek, posiadających właściwości migracyjne, regeneracyjne i immunomodulacyjne (Lindner, Kramer, Rohwedel i Schlenke, 2010b).

Nomenklatura MSC budzi szereg kontrowersji, zarówno ze względu na „mezenchymalne” pochodzenie, jak i „macierzystość” komórek. W ostatnich badaniach dowodzi się, że najwcześniejsza pula MSC jest generowana w populacji komórek grzebienia nerwowego wykazujących ekspresję Sox1, sugerując raczej ich neuroektodermalne, a nie mezodermalne pochodzenie. Ponadto nisko-selektywna metoda izolacji przyczynia się do pozyskiwania mieszaniny komórek o zróżnicowanym potencjale do tworzenia klonów, wielokierunkowego różnicowania i samoodnowy. W porównaniu do komórek embrionalnych, powstających na wczesnym etapie rozwoju zarodkowego przed gastrulacją, które są zdolne do różnicowania we wszystkie typy komórek organizmu, z wyjątkiem łożyska, MSC pozyskane z tkanek dorosłego organizmu cechują się znacznie zmniejszonym potencjałem do różnicowania. Wykazuje się również ograniczoną liczbę podziałów tych komórek, które po kilkunastu pasażach w hodowlach 2D starzeją się i zamierają. Z tego względu wydaje się, że odpowiedniejszą nazwą dla MSC jest „mezenchymalne komórki zrębu” (ang. Mesenchymal Stromal Cells), niż „mezenchymalne komórki macierzyste” (Lindner i in., 2010a). W celu uporządkowania nomenklatury Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej (ang. International Society for Cellular Therapy, ISCT) w 2005-2006 roku podjęło próbę wyznaczenia minimalnych kryteriów dla mezenchymalnych multipotencjalnych komórek macierzystych. Zgodnie z zaleceniami Towarzystwa do mezenchymalnych komórek macierzystych można zaliczyć komórki spełniające następujące warunki: 1) przyleganie do podłoża *in vitro*, 2) wrzecionowaty, podobny do fibroblastów kształt, 3) synteza antygenów powierzchniowych CD73, CD90, CD105, przy braku syntezy antygenów CD45, CD34, CD14 lub CD11b, CD79 α lub CD19 i HLA-DR oraz 4) zdolność do różnicowania *in vitro* w kierunku

chondrocytów, osteocytów i adipocytów (Horwitz i in., 2005; Dominici i in., 2006). ISCT sugeruje również zastąpienie w nazwie terminu „macierzyste” na „zrębu”, ze względu na niepełny macierzysty charakter komórek. Obecnie wiele grup postuluje zawężenie tych kryteriów, bądź dodanie nowych, które lepiej charakteryzowałyby mezenchymalne komórki macierzyste (MSC) i odróżniały je od tak samo oznaczanych skrótami mezenchymalnych komórek zrębu (MSC).

Multipotencjalne komórki macierzyste rezydują w większości tkanek, tworząc tzw. nisze, są łatwe w pozyskaniu i można je w sposób bezinwazyjny wyizolować z tkanek płodu lub w sposób mało inwazyjny z tkanek dorosłego organizmu (Van, 2011; Hass, Kasper, Böhm i Jacobs, 2011). Według ostatnich doniesień komórki te wywodzą się z nisz okołonaczyniowych, tworzących gęstą sieć w całym organizmie (Crisan i in., 2008).

Najstarszym, wzorcowym i do niedawna najpopularniejszym źródłem mezenchymalnych komórek macierzystych jest szpik kostny. Zaletą izolacji mezenchymalnych komórek macierzystych ze szpiku kostnego (ang. Bone Marrow Mesenchymal Stem cells, BM-MSC) jest stosunkowo prosta i bezpieczna metoda aspiracji. Niestety komórki izolowane ze szpiku kostnego cechują się znaczną heterogennością, w większości należą do linii krwiotwórczej i tylko niewielka ich frakcja wykazuje cechy mezenchymalnych komórek macierzystych. Ponadto jak się okazało w późniejszych badaniach, wykazują istotnie niższy potencjał proliferacyjny w porównaniu chociażby do komórek pochodzących z tkanki tłuszczowej (ang. Adipose Derived Stem Cells, ADSC), czy galarety Whartona (ang. Wharton's jelly mesenchymal stem cells, WJ-MSC) (Pittenger i in., 1999; Drela i in., 2016). Coraz większą popularnością cieszą się komórki pochodzące z tkanki tłuszczowej. Populacja MSC wyizolowana z tego źródła cechuje się wyższą homogennością i potencjałem proliferacyjnym w porównaniu do BM-MSC. Wykazano, że kilka do kilkunastu procent spośród ADSC zajmują progenitory śródbłonna, poprawiające właściwości angiogenne tej populacji (Zhang i in., 2006b; Wagner i in., 2005). Raportuje się również możliwość izolacji MSC z innych tkanek somatycznych takich jak okostna (ang. Periosteum-Progenitor Mesenchymal Stem Cells, PPMC) (Choi i in., 2008), błona i płyn maziówkowy (ang. Synovial Membrane Mesenchymal Stem Cells, SM-MSC and Synovial Fluid Mesenchymal Stem Cells, SF-MSC) (Zhu i in., 2017), mięśnie szkieletowe (ang. Muscle Derived Stem Cells, MDSC) (Ceusters i in., 2017), skóra (ang. Skin-derived Mesenchymal Stem Cells, S-MSC) (Niezgoda i in., 2017; Bartsch i in., 2005; Riekstina i in., 2008), endometrium (ang. Endometrial Mesenchymal Stem Cells, eMSC) (Schüring i in., 2011), krew obwodowa (ang. Peripheral Blood Mesenchymal Stem Cells, PB-MSC) (Ab Kadir i in., 2012) i menstruacyjna (ang. Menstrual Blood Mesenchymal Stem Cells, MenSC) (Allickson i in., 2011), więzadła przyzębia (ang. Periodontal Ligament Stem Cells, PDLSC) i miazga zębów (ang. Dental Pulp Stem Cells, DPSC) (Seifrtová i in., 2012; Huang, Gronthos i Shi, 2009).

Poza tkankami somatycznymi duże zainteresowanie wzbudzają również MSC pochodzące z tkanek płodu, a w szczególności z galarety Whartona sznura pępowiny. Komórki te można pozyskać w łatwy i całkowicie bezinwazyjny sposób ze sznura pępowiny bezpośrednio po porodzie. W badaniach porównawczych dowiedziono, że galareta Whartona jest najbogatszym źródłem komórek o macierzystym charakterze, a same WJ-MSC wykazują najwyższy potencjał proliferacyjny spośród BM-MSC i ADSC. Istotną kwestią szczególnie w aspekcie ewentualnych przeszczepów allogenicznych tej populacji jest najniższa immunogenność w porównaniu do mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących ze szpiku czy tkanki tłuszczowej (Weiss i in., 2003; Mitchell i in., 2003). Innymi źródłami MSC z tkanek płodu są krew pępowinowa (ang. Peripheral Blood

Mesenchymal Stem Cells, PB-MS) (Lee i in., 2004), błona podowodniowa (ang. Amniotic Membrane Mesenchymal Stem Cells, AM-MS) (Karahuseyinoglu i in., 2007, 2008), łożysko (ang. Placental Mesenchymal Stem Cells, P-MS) (Choi i in., 2017), płyn owodniowy (ang. Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells, AF-MS) (In 't Anker i in., 2003).

Obecnie nie ma unikatowego i specyficznego markera charakteryzującego komórki mezenchymalne, dlatego do ich oznaczania wykorzystuje się zestaw „pozytywnych” i „negatywnych” markerów wyszczególnionych przez ISCT. Niestety, żaden z tych antygenów nie pozwala na rzetelną charakterystykę macierzystego potencjału, ani na ocenę czystości wyizolowanej populacji, ponieważ większość z nich występuje również na powierzchni innych typów komórek. Część badaczy uważa, że MS) są mieszaniną m.in. perycytów, fibroblastów, komórek przydanki, adipocytów, czy osteocytów, w większości ekspresjonujących CD73, CD90 i CD105, spośród których w niewielkiej ilości można znaleźć komórki o macierzystym charakterze. W zależności od źródła izolacji występują nieznaczne różnice w ekspresji markerów powierzchniowych (Tabela 1.). Przykładowo wykazuje się że WJ-MS) i BM-MS) ekspresjonują CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, przy braku obecności CD14, CD34, CD45, CD11b, HLA-DR. Natomiast „typowym” zestawem markerów dla ADSC jest CD9, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, HLA I, przy braku ekspresji CD14, CD31, CD34, CD45, CD133, CD144, HLA-DR, STRO-1 i HLA II. W badaniach porównawczych BM-MS) i ADSC De Ugarte i wsp. wykazali, że oba typy komórek posiadają podobny poziom ekspresji dla CD13, CD29, CD44, CD90, CD105, CD73 i STRO-1, przy czym różnią się one obecnością CD49d, CD54, CD34, CD106 (De Ugarte i in., 2003). Innymi markerami obecnymi na powierzchni mezenchymalnych komórek macierzystych są: CD10, CD49e, CD55, CD59, CD140b i CD117 (De Ugarte i in., 2003; Camilleri i in., 2016; Mitchell i in., 2006). Dosyć kontrowersyjną kwestią jest ekspresja markera progenitorów śródbłonna CD34. Braku obecności tego białka w hodowanych *in vitro* komórkach MS) dowodzi wiele badań (Obtulowicz i in., 2016; Lin, Ning, Lin i Lue, 2012). Mimo to według części badaczy świeżo wyizolowane komórki BM-MS) i ADSC spełniające wymagania ISCT również wykazują ekspresję CD34, przy czym zanika ona z czasem w hodowli *in vitro* (Lin i in., 2012). Na rozbieżności w ekspresji markerów powierzchniowych mezenchymalnych komórek macierzystych w różnych grupach badawczych może wpływać szereg czynników takich jak sposób izolacji, namnażania, pasażowania komórek, czas trwania hodowli. Ponadto, wykazuje się również różnice pomiędzy poszczególnymi dawkami czy gatunkami.

Aktualnie trwają badania nad znalezieniem markerów mezenchymalnych, umożliwiających wyizolowanie czystszej frakcji komórek o charakterze multipotencjalnym. Nowo zaproponowanymi markerami pozytywnymi są m.in. CD49b, STRO-1, CD271, CD200, SSEA-1, SSEA-4, a negatywnymi CD31, CD133, CD144 (Szala, Wiśniewska i Czapla, 2014). W licznych badaniach wykazuje się izolacje kolejnych subpopulacji mezenchymalnych komórek macierzystych różniących się poszczególnymi cechami. Busser i wsp. (2015) po zastosowaniu pozytywnej selekcji dla mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej, wykazujących jednoczesną ekspresję dla CD271, SUSD2, MSCA-1, CD44 i CD34, pozyskali frakcję komórek charakteryzującą się wyższym potencjałem multipotencjalnym i proliferacyjnym w porównaniu do tradycyjnie izolowanych ADSC (Busser i in., 2015). W badaniach Cuthbert i wsp. (2015) przy użyciu metody FACS, ze szpiku kostnego wyizolowano komórki posiadające na swojej powierzchni CD73 i CD271. Badacze utrzymują że zastosowanie powyższych markerów poprawia czystość MS), a pozyskane komórki cechują się zwiększoną ekspresją markerów związanych z tkanką kostną i naczyniami krwionośnymi: BMP-2,

COL1A2, VEGF-C i SPARC (Cuthbert i in., 2015). W innych badaniach dowodzi się, że zastosowanie do pozytywnej selekcji markerów CD271/CD90/CD106 skutkuje izolacją wysoce klonogennych, stabilnych genetycznie MSC (Pérez-Silos, Camacho-Morales i Fuentes-Mera, 2016). Interesującą subpopulacją, uzyskaną w wyniku sortowania wykazujących ekspresję SSEA-3 mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej, są tzw. „Muse cells”. Grupa kierowana przez profesor Dezawę wykazała, że pozyskane komórki poza ekspresją typowych markerów mezenchymalnych (CD105, CD90, CD29) wykazywała również ekspresję markerów pluripotencjalnych takich jak Nanog, Oct3/4, PAR4, Sox2, i TRA-1-81. Te wysoce klonogenne komórki były zdolne do różnicowania w linii wywodzące się z trzech listków zarodkowych. Przy czym pozostałe komórki, nie wykazujące ekspresji SSEA-3, różnicowały się jedynie w kierunku mezodermalnym. Co ciekawe, nie wykazano ekspresji CD34 i CD146 uznawanych przez część badaczy jako typowe markery ADSC (Ogura i in., 2014).

Tabela 1. Porównanie ekspresji antygenów powierzchniowych mezenchymalnych komórek macierzystych w zależności od źródła ich pozyskania (tabela zmodyfikowana (Ullah, Subbarao i Rho, 2015))

Źródło	Obecność antygenów powierzchniowych	Brak antygenów powierzchniowych
Szpicik kostny	CD73, CD90, CD105, STRO-1	CD14, CD34, CD45, HLA-DR
Galareta Whartona	CD73, CD90, CD105	CD14, CD34, CD45, CD79, CD11b, HLA-DR
Tkanka tłuszczowa	CD73, CD090, CD29, CD44, CD71, CD105, CD13, CD166, STRO-1	CD14, CD31, CD34, CD45
Błona i płyn owodniowy	CD29, CD44, CD90, CD105, CD, SH2, SH3, HLA-DR	CD10, CD14, CD34, HLA-DR
Więzadła przyzębia i miazga zębów	CD29, CD44, CD90, CD105	CD14, CD34, CD45
Krew obwodowa	CD44, CD90, CD105, HLA-ABC	CD45, CD133
Łożysko i błony płodowe	CD29, CD73, CD90, CD105	CD34, CD45
Skóra	CD44, CD73, CD90, CD105, CD166, SSEA-4,	CD34, CD45, HLA-DR
Endometrium	CD73, CD90, CD105, CD146	CD34, CD45

Uważa się, że mezenchymalne komórki macierzyste wykazują potencjał do różnicowania *in vitro* we wszystkie trzy linie; mezodermalną, ektodermalną i endodermalną. Do niedawna sądzono, że MSC są zdolne do różnicowania jedynie w komórki tkanek pochodzących z mezodermy. Część badaczy wysunęło jednak hipotezę, według której mają one również zdolność do różnicowania *in vitro* w linii innego listka zarodkowego (Ullah i in., 2013; Woodbury, Schwarz, Prockop i Black, 2000).

Wzbudziło to szereg kontrowersji, które zostały przełamane dopiero po latach badań. Istnieje wiele doniesień potwierdzających efektywne różnicowanie MSC w osteoblasty, chondrocyty, adipocyty (Drela i in., 2014), mioblasty (Okamura i in., 2017), kardiomiocyty (Sung i in., 2016), hepatocyty (Fanti i in., 2017), tenocyty (Lee i in., 2017), komórki śródbłonka (Obtulowicz i in., 2016; Li i in., 2017), czy nawet neurony (Marei i in., 2017; Jiang i in., 2002). W zależności od tkanki z jakiej wyizolowano mezenchymalne komórki macierzyste obserwuje się różny potencjał do różnicowania w określone typy komórek (Ullah, Subbarao i Rho, 2015). Przykładowo, w porównawczej analizie wykazano niższą dynamikę różnicowania w osteocyty i chondrocyty komórek mezenchymalnych pochodzących z tkanki tłuszczowej w stosunku do komórek mezenchymalnych wywodzących się ze szpiku kostnego (Im, Shin i Lee, 2005). W innej pracy komórki mezenchymalne pochodzące z galarety Whartona przejawiały wyższy potencjał osteogenetyczny oraz mniejszy adipogenetyczny w porównaniu do komórek mezenchymalnych pochodzących ze szpiku kostnego (Drela i in., 2016).

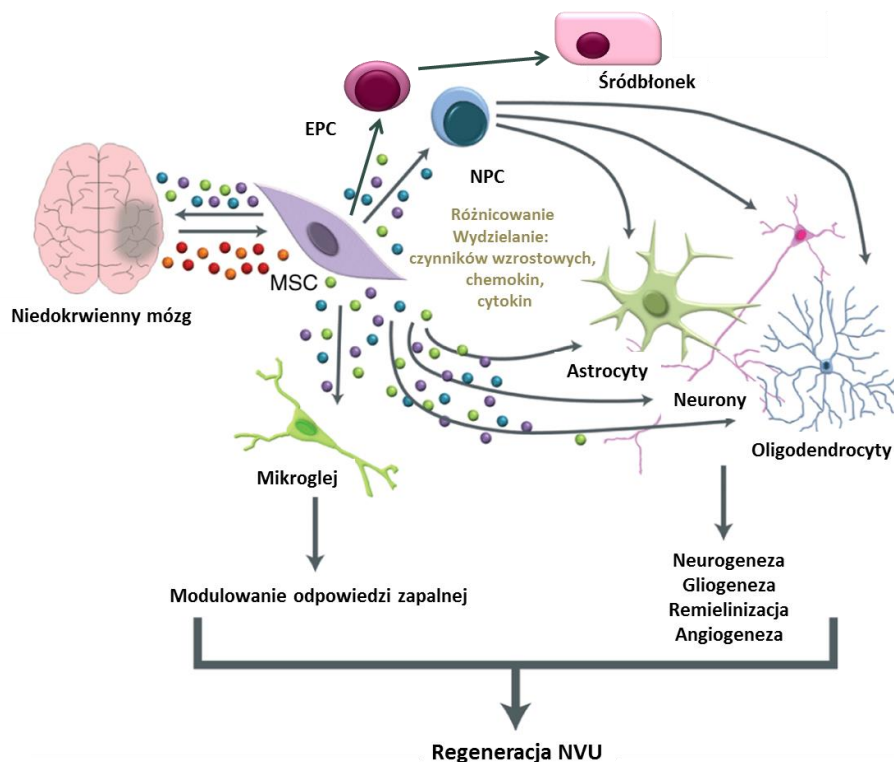
Ze względu na rosnące zainteresowanie komórkami mezenchymalnymi do zastosowania w nowoczesnej medycynie regeneracyjnej, a w szczególności w leczeniu uszkodzeń spowodowanych niedokrwieniem mózgu, szalenie interesujący jest potencjał do różnicowania tych komórek w składowe jednostki neuronaczyniowej, w tym w komórki nerwowe i śródbłonka. Pomimo mezodermalnego pochodzenia, niezależnie od źródła izolacji, MSC wykazują zdolność do różnicowania w kierunku neuralnym w odpowiedzi na pożywki różnicujące wzbogacone czynnikami wzrostowymi, takimi jak: HGF (ang. Hepatocyte Growth Factor, czynnik wzrostu hepatocytów), FGF, czy EGF. W wyniku aktywacji ścieżki neuronalnej w MSC otrzymano komórki o fenotypach specyficznych dla: oligodendrocytów, neuronów cholinergicznym i dopaminergicznym (Kang i in., 2003; Safford i in., 2002; Barzilay i in., 2009; Datta i in., 2011). W innych badaniach komórki mezenchymalne pochodzące ze szpiku kostnego indukowane przez 1 dzień β -merkaptopetanołem, a następnie różnicowane przez 6 dni przy pomocy NGF, nabrały cech neuronalnych komórek dopaminergicznym (Naghdi, Tiraihi, Namin i Arabkheradmand, 2009). Wiele prac wskazuje również na czynniki wspomagające różnicowanie, takie jak cAMP, insulina, kwas retinowy, kwas walproinowy, hydrocortyzon (Anghileri i in., 2008; Schäffler i Büchler, 2007; Rooney i in., 2009). Innymi czynnikami stymulującymi ukierunkowanie neuronalne komórek mezenchymalnych są: GDNF (ang. Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor, glijopochodny czynnik neurotroficzny), BDNF, IBMX (ang. 3-IsoButyl-1-MethylXanthine, izobutylometyloksantyna), czy indometacyna (Pavlova i in., 2012). W wyniku zastosowania odpowiednich protokołów różnicowania można otrzymać dojrzałe lub progenitorowe komórki o cechach neuronalnych lub glijowych *in vitro* bądź *in vivo*, wykazujące między innymi markery: neuralne- nestynę i Musashi1, neuronalne- białka neurofilamentów, β -tubulinę III, synapsynę i MAP2, astrocytarne- GFAP i oligodendrocytarne- O1, MBP i GalC (Alexanian, 2010; Hermann i in., 2004; Nagai i in., 2007). Zgodnie z oczekiwaniami stopniowy wzrost ekspresji markerów neuralnych idzie w parze ze zmianami morfologicznymi, charakterystycznymi dla poszczególnych typów komórek nerwowych (Okolicsanyi, Griffiths i Haupt, 2014). Ponadto, w wyniku różnicowania komórek mezenchymalnych β -merkaptopetanołem i kwasem retinowym lub β -hydroksyanizolem zaobserwowano ekspresję dwóch białek eag1 i eag2, uczestniczących w transporcie jonów K^+ (Mareschi i in., 2006). W szeregu artykułów wykazuje się zdolność do różnicowania neuralnego komórek mezenchymalnych pochodzących z różnych źródeł (Ullah, Subbarao i Rho, 2015). Mimo to, istnieje pogląd, zgodnie z którym MSC pochodzące z niedojrzałych tkanek mogą efektywniej różnicować się w kierunku neuralnym ze względu na

zwiększoną plastyczność (Taran i in., 2014). Ponadto, w części prac wykazuje się, szczególnie istotną w aspekcie regeneracji uszkodzonej tkanki nerwowej, spontaniczną ekspresję wczesnych markerów neuralnych, w tym nestyny, TUJ-1 we wczesnych hodowlach komórek mezenchymalnych wyizolowanych ze szpiku kostnego (Tondreau i in., 2004). W badaniach porównawczych, wykazano zwiększony poziom ekspresji nestyny, GFAP i NF-200 w hodowli komórek mezenchymalnych, zarówno we wczesnych jak i późnych pasażach, pochodzących z galarety Whartona w porównaniu do komórek mezenchymalnych pochodzących ze szpiku kostnego (Drela i in., 2016).

Część badaczy wykazuje, że MSC są również zdolne do różnicowania w kierunku śródbłonna. Czynniki wzrostowe, śródbłonkowe naprężenie ścinające (ang. endothelial shear stress), skład macierzy zewnątrzkomórkowej, wpływają na efektywność tego różnicowania, w tym na ekspresję markerów endotelialnych, wychwytywanie lipoproteiny niskiej gęstości (LDL) i tworzenie sieci pseudokapilarnych (Portalska i in., 2012). Jednym z podstawowych czynników zaangażowanych w różnicowanie śródbłonkowe komórek mezenchymalnych jest czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) (Li i in., 2017). Ponadto, w celu wzmocnienia jego działania stosuje się dodatkowo kompozycję następujących czynników: bFGF, heparynę, IGF-1, EGF, hydrokortyzon i kwas askorbinowy (Deng i in., 2015). W wielu publikacjach sugeruje się również hodowlę różnicowanych komórek w naczynkach pokrytych kolagenem IV, fibronektyną lub białkami macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM) (Konno i in., 2010; Zhang i in., 2011; Deng i in., 2015). W wyniku zastosowania odpowiednich protokołów różnicowania można otrzymać zarówno progenitorowe jak i dojrzałe komórki śródbłonna *in vitro* i *in vivo*, wykazujące markery śródbłonkowe takie jak: PECAM-1, TIE-1 i TIE-2, VEGFR-1 i VEGFR-2, VE-kadheryna, VCAM-1 oraz czynnik von Willebranda (ang. von Willebrand Factor, vWF) (Deng i in., 2015; Chen, Lie, Li i Wei, 2009; Gang i in., 2006). Na wczesnym etapie różnicowania komórki są wrzecionowate i wykazują nieznaczną proliferację, z czasem zmieniają kształt na sześcienny, a ich potencjał proliferacyjny rośnie. Na skutek różnicowania komórki mezenchymalne wykazują cechy czynnościowe dojrzałych komórek śródbłonna, w tym zdolność do wychwytywania LDL i wiązania lektyny oraz tworzenia sieci pseudokapilarnych na macierzy zewnątrzkomórkowej. Najpopularniejszymi źródłami komórek mezenchymalnych, w których potwierdzono efektywne różnicowanie śródbłonkowe są tkanka tłuszczowa (Zhang i in., 2011; Deng i in., 2015) i szpik kostny (Oswald i in., 2004; Portalska i in., 2012), nieliczne źródła wspominają również o galarecie Whartona (Chen i in., 2009) i owodni (König i in., 2012), czy krwi pępowinowej (Gang i in., 2006). Mimo to w porównawczej pracy grupy profesora Xing Wei, wykazano wyższą ekspresję specyficznych markerów śródbłonkowych oraz większą złożoność sieci pseudokapilarnych w różnicowanych śródbłonkowo komórkach mezenchymalnych pochodzących z galarety Whartona w porównaniu do komórek mezenchymalnych pochodzących ze szpiku (Chen i in., 2009).

1.3.2 Proponowane mechanizmy działania regeneracyjnego mezenchymalnych komórek macierzystych w mózgu

Specyficzne właściwości komórek mezenchymalnych czynią je doskonałym kandydatem do zastosowania w nowoczesnej medycynie regeneracyjnej. Szczególnie cennymi właściwościami komórek MSC w aspekcie regeneracji są: szczególny potencjał do różnicowania się do fenotypów komórek wywodzących się z mezodermy, jak również wciąż dyskutowana możliwość rozszerzonego ukierunkowania do komórek ekto- i endodermalnych. Temu wielokierunkowemu różnicowaniu towarzyszy zdolność do wydzielania szeregu różnorodnych cytokin, chemokin i czynników wzrostowych w zależności od kontekstu środowiskowego (Ryc. 4.). Dowiedziono, że komórki mezenchymalne potrafią w sposób aktywny reagować na otaczające mikrośrodowisko poprzez zmianę profilu sekrecji czynników wpływających m.in. na proliferację, różnicowanie i dojrzewanie różnorodnych komórek progenitorowych w mózgu (Tabela 2.) (van Velthoven, Kavelaars i Heijnen, 2012). Na przestrzeni ostatnich lat przeprowadzono szereg badań nad regeneracyjnymi właściwościami mezenchymalnych komórek macierzystych w uszkodzonej niedokrwieniem tkance nerwowej. Zaobserwowanymi skutkami tych terapii eksperymentalnych, prowadzonych zarówno w modelach *in vitro* jak i *in vivo* były: zwiększona neurogenезa i angiogenезa, modulacja gliogenезy, hamowanie odpowiedzi zapalnej, przebudowa uszkodzonej tkanki, a w konsekwencji zmniejszenie ogniska udarowego oraz poprawę stanu neurologicznego chorego (D'souza i in., 2015).



Ryc. 4. Schemat przedstawiający hipotetyczne działanie komórek mezenchymalnych (wg. (van Velthoven, Kavelaars i Heijnen, 2012) w modyfikacji własnej).

Tabela 2. Lista wybranych czynników wydzielanych przez komórki mezenchymalne i wpływających pozytywnie na regenerację (zmodyfikowana tabela wg. (Bai i in., 2016)).

Działanie	Wydzielane czynniki
Immunomodulacyjne	IL-6, IL-10, HGF, LIF, TGF β , CCL-2/MCP-1, CCL-5/RANTES, VEGF, PGE ₂ , ICAM
Przeciwzapalne	IL-1Ra, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- α
Angiogenne	aFGF, bFGF, CXCL-5, CXCL-12, EGF, FGF9, HBEGF, IGF, IL-6, IL-8, IL-11, MMP-2, NTF-3, PDGF-AA, PDGF-BB, PGF, PLGF, TNFSF-4, VEGF, VEGF-D
Neurogenne	EGF, MDK, NTF3
Neuroprotekcyjne	G-CSF, VEGF, GDNF, BDNF
Stymulacja migracji MSC	SDF-1, CXCR-1, TNF- α , bFGF, IGF-1, PDGF
Stymulacja migracji komórek endogennych	CXCL12, EGF, FGF-2, GCSF, HGF, IL-6, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-2, RANTES, TGF-1, VEGF-A, SDF-1, FK
Stymulacja komórek progenitorowych	IL-6, FGF-2, PDGF-AA, PDGF-BB, EGF

Jednym z proponowanych podstawowych mechanizmów regeneracyjnego działania komórek mezenchymalnych jest ich zdolność do odbierania i swoistej reakcji na sygnały zapalne, migracji do miejsca uszkodzenia (chemotaksja), a po zasiedleniu (ang. homing) wywierania pozytywnego wpływu na procesy naprawcze w ciągle nie w pełni poznanych mechanizmach parakrynnych i repopulacyjnych (Li i in., 2016b). W badaniach *in vivo* wykazano, że przeszczepione komórki mezenchymalne pochodzące ze szpiku kostnego i krwi pępowinowej gromadzą się głównie w miejscach uszkodzenia (strefie półcienia) i endogennej neurogenezy (SVZ) (Park i in., 2014a; Kozłowska i in., 2007). Mikrogleję i astrocyty, w odpowiedzi na niedokrwienie wydzielają zrębowy czynnik wzrostu 1 (SDF-1), będący ligandem dla receptora CXCR-4 ekspresjonowanego przez MSC. W wyniku interakcji w osi SDF-1 i CXCR-4 transplantowane komórki migrują do miejsca uszkodzenia (Yu i in., 2012). W innych badaniach potwierdzono wcześniejsze przypuszczenia, że czynnik chemotaktyczny CX3CL1/ fraktalkina poprzez receptor CXCR1 aktywuje ścieżkę sygnałową Jak2-Stat5alfa-ERK1/2, co w efekcie prowadzi do zmian strukturalnych w obrębie uszkodzenia (Zhang i in., 2015). Wykazano, że hamowanie integryny β 1 obecnej na BM-MSC zaburza dimeryzację z integryną α 4, która jest niezbędna do rozpoznania antygenu 4 (ang. Very Late Antigen 4, VLA-4) oddziaływującego ze śródbłonkową cząsteczką VCAM-1 i hamującą integrację BM-MSC ze śródbłonkiem naczyń (De Becker i Riet, 2016).

Pomimo licznych badań wciąż nie wiadomo w jaki sposób komórki mezenchymalne podane donaczyniowo mogą pokonywać barierę krew-mózg i przechodzić do parenchymy. Dane eksperymentalne są wysoce kontrowersyjne co do samego istnienia mechanizmu i znaczenia tego zjawiska. Przypuszcza się, że jest w to zaangażowany mechanizm podobny do diapedezy leukocytów (De Becker i Riet, 2016). W transmigracji czy też wynaczynieniu komórek mezenchymalnych podawanych systemowo po udarze mózgu i spowodowanym najpewniej strukturalnym uszkodzeniu błony naczyń w wyniku powstającej martwicy, biorą udział metaloproteinazy MMP-2 i MMP-9 degradujące komponenty błony podstawnej i inne mniej specyficzne enzymy proteolityczne. Czynnikami indukującymi migrację do miejsca uszkodzenia, poza omawianymi już osiami SDF1/CXCR4

czy CX3CL1/CXCR1 i powstającymi okołonaczyniowymi ścieżkami migracyjnym, są też czynniki wzrostowe takie jak PDGF AB i BB oraz HGF (De Becker i Riet, 2016).

Jak wspomniano wcześniej MSC prawdopodobnie wykazują zdolność do różnicowania w różne typy komórek, również te będące składową jednostki neuronaczyniowej, w tym w neurony, głą i śródbłonek. Możliwość ich przeszczepienia daje szansę na zastąpienie zdegenerowanych komórek (ang. repopulation) i redukcję obszaru uszkodzenia. W modelu MCAO, w wyniku transplantacji komórek mezenchymalnych pochodzących z tkanki tłuszczowej do tętnicy szyjnej wewnętrznej szczura zaobserwowano znaczne zmniejszenie deficytów neurologicznych, a po 28 dniach stwierdzono ich obecność w ognisku uszkodzenia gdzie wykazywały ekspresję markerów neuronalnych (NeuN i GFAP) (Jiang i in., 2014). W innym badaniu, po 6 tygodniach od podania szczurom po ischemicznym udarze mózgu ludzkich komórek mezenchymalnych ze szpiku kostnego w iniekcji domózgowej, zaobserwowano również ekspresję markerów głąjowych (GFAP, GalC) i neuronalnych (β III tubulina, NF200, NSE i NF70). Z drugiej strony w pracy grupy profesora Cobi J. Heijjena stwierdzono, że przeszczepione do uszkodzonego niedokrwieniem mózgu komórki mezenchymalne wykazują niską przeżywalność i pomimo początkowej lokalizacji w miejscu uszkodzenia nie zastępują uszkodzonych komórek mózgu. Badacze sugerują, że zaobserwowana poprawa funkcjonalna jest raczej związana z aktywną odpowiedzią transplantowanych komórek na mikrośrodowisko tkanki i wydzielaniem przez nie czynników przeciwzapalnych i pro-regeneracyjnych (Tabela 2.) (van Velthoven, Kavelaars i Heijnen, 2012).

Poza różnicowaniem w kierunku neuronalnym, w niektórych badaniach opisywana jest również, zdolność transplantowanych MSC do różnicowania w kierunku progenitorów śródbłonek (EPC), które mogą odgrywać zasadniczą rolę w regeneracji uszkodzonych mikronaczyń i przywróceniu prawidłowego funkcjonowania jednostki neuronaczyniowej po udarze niedokrwinnym mózgu (Aguilera i in., 2014).

Obecnie brak jest bezpośrednich danych dotyczących domózgowych transplantacji mezenchymalnych komórek macierzystych po ich zróżnicowaniu w kierunku śródbłonek. Istnieje jednak szereg badań nad potencjalnym udziałem komórek MSC w regeneracji uszkodzonych dużych naczyń krwionośnych innych narządów (Huang i Li, 2008). W jednym z nich, szczurze komórki mezenchymalne pochodzące ze szpiku i rosnące na poliuretanowej rurce wszczepiono *in vivo* do aorty szczura. Po 2 tygodniach zaobserwowano, że MSC są zorganizowane w wielokomórkowe struktury przypominające ściany naczyń i wykazujące typową dla nich ekspresję markera mięśniówki gładkiej SMC (ang. Smooth Muscle Cell Marker) (Mirza i in., 2008). W innych badaniach, ludzkie komórki mezenchymalne różnicowane przez 5 dni w kierunku śródbłonek i wykazujące ekspresję markerów endotelialnych (vWF, VEGFR-2, VEGFR-1, Tie-2, VCAM-1, PECAM-1, VE-kadheryna) wszczepiono podskórnym myszom SCID (ang. Severe Combined Immunodeficiency, ciężki złożony niedobór odporności). Po 30 dniach wykonano analizę histo- i immunohistochemiczną pobranej tkanki. Stwierdzono, że wszczepione mezenchymalne komórki macierzyste uczestniczą w tworzeniu nowych naczyń krwionośnych (Allameh, Jazayeri i Adelpour, 2016). Możliwość zróżnicowania komórek mezenchymalnych w kierunku śródbłonek *in vitro*, a następnie po transplantacji, wbudowania ich do endogennych struktur naczyniowych, daje nadzieję na wykorzystanie tego fenomenu w regeneracji uszkodzonych naczyń krwionośnych i poprawie funkcji całej jednostki neuronaczyniowej w mózgu.

Neuroprotekcyny efekt transplantacji MSC wiąże się między innymi z wydzielaniem przez MSC neurotrofin oraz/lub ze stymulacją przez MSC komórek endogennych do ich wydzielania. W szeregu badań w modelach zwierzęcych patologii mózgu wykazano, że w wyniku transplantacji komórek mezenchymalnych istotnie wzrasta tkankowy poziom SDF-1, VEGF, GDNF, BDNF, NGF, IGF, EGF, bFGF oraz IL-6. Czynniki te charakteryzują się m. in. działaniem antyapoptotycznym, antyoksydacyjnym i przeciwzapalnym. W badaniach *ex vivo* potwierdzono wzrost ekspresji i wydzielania m. in. IL-1 β i IL-6. Obie wydzielane przez MSC interleukiny zwiększały przeżywalność neuronów (van Velthoven i in., 2013). W badaniach Botto i wsp. (2010) wykazano, że poza właściwościami angiogennymi, IL-6 wpływa również na zwiększenie przeżywalności komórek endotelialnych poprzez indukcję surwiwiny (Botto i in., 2011). W badaniach Gu i wsp. (2016) wykazano, że we współhodowli uszkodzonych w wyniku czasowego pozbawienia glukozy i tlenu astrocytów z komórkami mezenchymalnymi, doszło do zwiększonej ekspresji białka antyapoptotycznego Bcl-2 (ang. B-cell Lymphoma 2) i zmniejszenia ekspresji proapoptotycznego białka Bax (ang. Bcl-2-Associated X Protein), na skutek zwiększonej sekrecji IL-6. Co więcej, w badaniach *in vivo* wykazano, że zwiększone wydzielanie IL-6 przez komórki mezenchymalne po transplantacji do niedokrwionego mózgu szczura koreluje ze zmniejszonymi deficytami neurologicznymi (Gu i in., 2016).

Stymulacja endogennej neurogenezy jest następnym i niezwykle ważnym mechanizmem pro-regeneracyjnego działania komórek mezenchymalnych. Niedługo po uszkodzeniu niedokrwionym dochodzi do samoistnej proliferacji progenitorów neuralnych. Jednak wydaje się, że są to komórki nietrwałe, które do przeżycia potrzebują dopływu odpowiednich sygnałów troficznych oraz włączenia w miejscową, funkcjonalną sieć neuronalną poprzez wytworzenie z nią połączeń synaptycznych. Zaobserwowano, że w wyniku transplantacji BM-MSK do niedokrwionej półkuli mózgu dochodzi w niej do zwiększenia ekspresji synaptofizyny, białka związanego ze wzrostem neurytów (GAP-43) i koneksyny-43 (Cx43) odgrywającej istotną rolę w połączeniach międzykomórkowych. Podwyższenie ekspresji powyższych białek usprawnia komunikację między astrocytami a neuronami, co skutkuje zwiększoną przeżywalnością neuronów, homeostazą jonową, usprawnionym wychwytem neuroprzekazników, neurogenezą i synaptogenezą (Zhang i in., 2006a) (Koh i in., 2008). Po podaniu donacyniowym komórek mezenchymalnych wywodzących się z tkanki tłuszczowej obserwowano znaczący wzrost ekspresji markera migrujących neuroblastów doublekortyny w okolicy niedokrwionego uszkodzenia mózgu (Leu i in., 2010). W innych badaniach zaobserwowano zwiększoną proliferację, migrację i różnicowanie endogennych progenitorów neuralnych w niedokrwionej półkuli mózgu po podaniu MSC pochodzących ze szpiku kostnego (Bao i in., 2011).

Według części badaczy działanie neurogenne komórek mezenchymalnych jest wtórnym efektem ich wpływu na regenerację uszkodzonych naczyń krwionośnych i usprawnienie krążenia mózgowego (Hao i in., 2014). Jednym z czynników koniecznych do pobudzenia neurogenezy tak zdrowej jak i uszkodzonej tkanki jest aktywacja naczyniotwórczego VEGF-A, wydzielanego aktywnie przez komórki śródbłonkowe jak i transplantowane komórki mezenchymalne. Wydaje się, że **związek angiogenezy z neurogenezą** jest zjawiskiem symetrycznym, współzależnym i koniecznym do regeneracji uszkodzonej tkanki po niedokrwieniu. W embrionalnych hodowlach organotypowych ze szczurzych mózgow, w wyniku podania VEGF-A zaobserwowano zwiększoną współ-ekspresję markera proliferacji BrdU z markerem neuralnym ENCAM (ang. Embryonic Nerve Cell Adhesion Molecule) (Jin

i in., 2002). Donaczeniowe podanie VEGF-A szczurom również zwiększyło liczbę dzielących się neuralnych komórek progenitorowych ekspresjonujących VEGFR2 lub DCX oraz BrdU w rejonach neurogennych (Sun i in., 2003). Podobną rolę w neurogeniezie przypisuje się również VEGF-B (Sun i in., 2006).

W licznych badaniach potwierdzono, że MSC wydzielają również w sposób ciągły neurotroficzny czynnik BDNF. W modelu MCAO po transplantacji mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego znacząco wzrosła ekspresja tego czynnika, korelując z poprawą funkcjonalną (Kurozumi i in., 2004). W badaniach van Velthoven i wsp. (2011) wykonano dwie transplantacje komórek mezenchymalnych, przy czym stwierdzono, że każde podanie różniło się efektem regeneracyjnym. W wyniku pierwszej transplantacji wykonanej po 3 dniach od uszkodzenia niedokrwiennego zaobserwowano zwiększenie ekspresji bFGF, EGF, GDNF, białka Sonic hedgehog (SHH) w mózgu szczura. Czynniki te stymulują proliferację, migrację i różnicowanie neuralne w kierunku neuronów i oligodendrocytów. Po drugiej transplantacji, wykonanej po 10 dniach od uszkodzenia, zaobserwowano zwiększoną ekspresję czynników biorących udział w końcowym różnicowaniu progenitorów neuralnych oraz w tworzeniu sieci neuronalnej, takich jak: neuropilina-1 i -2, neuregulina-1 i EphrinB2. Czynniki te uczestniczą w prawidłowym wzroście i ukierunkowaniu aksonów, tworzeniu synaps i innych procesach niezbędnych do plastyczności i funkcjonalnej integracji nowych neuronów z istniejącą siecią neuronalną (van Velthoven, Kavelaars, van Bel i Heijnen, 2011).

Innymi czynnikami neurotroficznymi, których sekrecja jest łączona z procesami naprawczymi w uszkodzonej tkance nerwowej są: HGF, NGF, bFGF i IGF-1. Czynniki te prawdopodobnie odgrywają znaczącą rolę w synaptogenezie, jak również neuroprotekcji, angiogenezie i regulacji odpowiedzi immunologicznej (Anderson i in., 2016). Jednym z nowo zaproponowanych mechanizmów działania regeneracyjnego komórek mezenchymalnych jest formowanie przez MSC połączeń (ang. biobridge formation) między ogniskiem uszkodzenia mózgu a niszami neurogennymi. W pracy Naoki Tajiri (2013) komórki mezenchymalne przeszczepione do mózgu szczura po urazie wewnątrzczaszkowym tworzyły swoistą ścieżkę wyznaczającą drogę migracji endogennych komórek prekursorowych ze strefy okołokomorowej (SVZ) do miejsca uszkodzenia. Miesiąc oraz trzy miesiące po transplantacji zaobserwowano istotną poprawę funkcji motorycznych i neurologicznych oraz znaczną redukcję uszkodzenia w porównaniu do kontroli (Tajiri i in., 2013; Duncan i in., 2015).

Poza wspomnianą zdolnością komórek mezenchymalnych do różnicowania w kierunku prekursorów śródbłonna (EPC), mogą one również stymulować angiogenezę poprzez bezpośredni kontakt z naczyniem lub poprzez wydzielanie do jego otoczenia całego zestawu czynników angiogennych, takich jak: bFGF, VEGF, TGF- β , BDNF, PDGF, angiopoetyna-1, IGF-1, GDNF, PLGF, IL-6 i MCP-1 (Tao, Han, Han i Li, 2016; Hao i in., 2014; Botto i in., 2011; Watt i in., 2013). W badaniach *in vitro* i *in vivo* Kwon i wsp. (2014) zaobserwowali zniesienie działania angiogenego MSC po zastosowaniu przeciwciał skierowanych przeciwko czynnikom angiogennym: VEGF, MCP-1 i IL-6 (Kwon i in., 2014). Dowiedziono też, że w wyniku transplantacji komórek mezenchymalnych pochodzących z tkanki tłuszczowej, dochodzi do zwiększenia liczby progenitorów śródbłonkowych EPC z ekspresją receptora CXCR4 w centralnej okolicy uszkodzenia niedokrwiennego (Leu i in., 2010). W indukcji angiogenezy przez komórki mezenchymalne bierze też udział ścieżka sygnałowa Notch (Guo i in., 2012). W badaniach *in vitro* wykazano, że inkubacja komórek śródbłonkowych z pożywką

zebraną z hodowli MSC, prowadzi do pobudzenia wydzielania VEGF-A (Boomsma i Geenen, 2012). W podobnych badaniach, w których wykorzystano pożywkę z hodowli MSC pochodzących ze szpiku kostnego lub tkanki tłuszczowej dowiedziono, że działanie angiogenne jest dodatkowo związane z wydzielaniem przez te komórki HGF, bFGF, IGF-1 i VEGF (Bhang i in., 2014; Sopko i in., 2010). Wykazano ponadto, że VEGF poza indukcją różnicowania MSC w kierunku śródbłonna, reguluje migrację i różnicowanie endogennych progenitorów endotelialnych oraz uczestniczy w rekrutacji tych komórek do miejsc uszkodzenia naczyń krwionośnych (Shimamura, Nakagami, Koriyama i Morishita, 2013). Poza wymienionymi powyżej czynnikami, komórki mezenchymalne wydzielają również SDF-1, który stymuluje proliferację komórek endotelialnych i tworzenie sieci pseudokapilarnych (Zhou i in., 2012). Komórki mezenchymalne, poza funkcją wydzielniczą i prawdopodobnym trans-różnicowaniem do komórek śródbłonna, mogą też pełnić rolę swoistego „rusztowania” ułatwiającego regenerację uszkodzonych naczyń przez proliferujące progenitory śródbłonna (Rohban, Etchart i Pieber, 2016).

Pomimo, że właściwości immunomodulacyjne i przeciwzapalne komórek mezenchymalnych są coraz lepiej poznawane, to nasza wiedza o ich mechanizmach molekularnych wciąż nie jest kompletna. Uważa się, że środowisko zapalne wiążące się z podwyższonym stężeniem IFN- γ , TNF- α , IL-1 α i IL-1 β stymuluje komórki mezenchymalne do produkcji przeciwzapalnych czynników immunosupresyjnych, chemokin i cząsteczek przylegania, m.in.: ligandów CXCR3 i CXCR5, ICAM-1 i VCAM-1. Współdziałanie tych czynników z ich swoistymi receptorami CXCR3 i CXCR5, VLA-4 i LFA-1 (ang. Lymphocyte Function associated Antigen 1, antygen typu 1 związany z funkcją leukocytów) oraz zwiększone lokalnie stężenie NO (wynikające z aktywacji syntazy tlenu azotu iNOS w transplantowanych MSC) prowadzi do akumulacji komórek odpornościowych w tej okolicy (Ma i in., 2014) i do zwiększenia ekspresjiIDO (ang. Indoleamine 2,3-dioxygenase, dioksygenaza 2,3-indoleaminy). Prowadzi to do wyciszenia odpowiedzi zapalnej limfocytów T (Meisel i in., 2004). W badaniach Leu i wsp. (2010) po transplantacji mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej zaobserwowano zmniejszenie się ekspresji IL-18, TLR4 i PAI-1 (ang. Plasminogen Activator Inhibitor 1, inhibitor aktywatora plazminogenu), skutkujące dalszym obniżeniem reakcji zapalnej w miejscu uszkodzenia niedokrwiennego (Leu i in., 2010). W modelu niedokrwienia mózgu u naczelnych, po transplantacji BM-MSCC wykazano istotne podwyższenie sekrecji IL-10, wiążące się z działaniem antyapoptotycznym i neurogennym oraz ze zmniejszeniem aktywacji astrocytów (Li i in., 2010). Produkcja przez MSC immunomodulacyjnej IL-6 stymuluje powstawanie regulatorowych limfocytów T wydzielających przeciwzapalną IL-10.

Warto tu dodać, że IL-6 jest znana zarówno ze swojego działania prozapalnego jak i przeciwzapalnego. Hamuje wydzielanie szeregu prozapalnych czynników, takich jak: IL-1, TNF α , GM-CSF, IFN γ i indukuje produkcję glukokortykoidów. Ponadto wykazano, że jest kluczowym czynnikiem biorącym udział w proliferacji subpopulacji komórek CD8+FoxP3+ o działaniu supresyjnym dla limfocytów pomocniczych Th17 (Kyurkchiev i in., 2014). W badaniach Yang i wsp. (2010) ekspresja endogennych cytokin i chemokin takich jak IL-13, MMP2 i MIP oraz czynników wzrostowych i ich receptorów: VEGF, neuropiliny, EPOR, TROY, NGFR i RAGE, była podwyższona po transplantacji komórek mezenchymalnych i korelowała z funkcjonalną oraz strukturalną regeneracją po MCAO u szczurów (Yang i in., 2010a). Przeciwnie, w badaniach prezentowanych przez Ming Yang (2010) nie stwierdzono zmian w poziomie cytokin zapalnych korelujących ze skalą uszkodzenia tkanki (np.IL-6, TNF- α , IFN- γ i MCP-1) po przeprowadzeniu transplantacji komórek mezenchymalnych w modelu niedokrwienia mózgu u myszy. W późniejszych badaniach Seung-Wan Yoo (2013) potwierdził jednak,

że w wyniku transplantacji MSC dochodzi do zahamowania ekspresji ważnego chemotaktycznego białka monocytów (MCP-1), które może być wskaźnikiem stopnia niedokrwienego uszkodzenia mózgu. Prowadzi to do zmniejszenia infiltracji tkanki przez komórki CD68 przechodzące przez uszkodzoną barierę krew-mózg. Natomiast zastosowanie inhibitora TGF- β lub transplantacja MSC z wyciszonym genem kodującym TGF- β znosi powyższe efekty przeciwzapalnego działania komórek mezenchymalnych (Yoo i in., 2013). W innych badaniach wykazano że wydzielane przez komórki mezenchymalne czynniki TGF- β i HGF we współkulturze typu „transwell” hamują proliferację limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ aktywowanych przez komórki dendrytyczne (Di Nicola i in., 2002). Wykazano również, że inkubacja komórek mezenchymalnych z IFN- γ doprowadza do ekspresji ligandu (ang. Programmed Death-Ligand 1, PDL-1) będącego inhibitorem odpowiedzi zapalnej (Sheng i in., 2008). Jak wspomniano poprzednio, komórki mezenchymalne stymulują również przejście zaktywowanych makrofagów typu M1 do fenotypu przeciwzapalnego M2 (Adutler-Lieber i in., 2013) oraz hamują różnicowanie i dojrzewanie komórek dendrytycznych wywodzących się z monocytów CD14⁺ (Jiang i in., 2005). Reakcja ta wydaje się być związana z produkcją przez MSC prostaglandyny E2 (Ma i in., 2014). Powyższe badania wykazują, że wydzielane przez komórki mezenchymalne czynniki odgrywają istotną rolę w hamowaniu zapalnej odpowiedzi immunologicznej.

1.3.3. Optymalizacja efektywności komórek mezenchymalnych w terapii niedokrwienia mózgu

Na przestrzeni ostatnich lat przeprowadzono liczne badania kliniczne wykazujące bezpieczeństwo stosowania mezenchymalnych komórek macierzystych w szeregu trudnych do leczenia chorób o komponentcie zapalnym i występujących na podłożu dysfunkcji układu immunologicznego. Do takich schorzeń można również zaliczyć encefalopatię poniedokrwinną mózgu indukowaną przebyłym udarem (Prasad i in., 2014; Steinberg i in., 2016; Bang, Lee, Lee i Lee, 2005; Banerjee i in., 2014). Niestety, prowadzone do tej pory badania kliniczne wykazują raczej umiarkowane i stosunkowo niespójne korzyści wynikające z zastosowania terapii komórkowej, wykorzystującej głównie mezenchymalne komórki zrębu (MSC), niezależnie od charakteru leczonych zespołów chorobowych. Wskazuje to na konieczność opracowania nowych sposobów tej terapii zwiększających powtarzalność osiągniętych efektów tego postępowania (Tyndall, 2011; Prasad i in., 2014).

Jednymi z głównych problemów związanych z transplantacją MSC z jakim mierzy się regeneracyjna medycyna praktyczna są: ograniczona liczba dostępnych komórek możliwa do jednorazowego pobrania od dawcy, stojąca w sprzeczności z wysoką efektywną dawką terapeutyczną oraz niska przeżywalność komórek po przeszczepie, a przy podaniach systemowych, wychwytywanie ich przez narządy filtrujące krew takie jak płuca lub śledziona. Osobnym i kosztownym problemem są czasem trudne do osiągnięcia wymagane systemy bezpieczeństwa biologicznego materiału transplantacyjnego, który musi być otrzymywany wg. standardów GMP (ang. Good Manufacturing Practice, dobra praktyka wytwarzania), a przede wszystkim ciągle niepełna wiedza o mechanizmach, od których zależy zmienny efekt terapeutyczny poszczególnych transplantacji. Bezpieczeństwo biologiczne materiału komórkowego, który uległ namnożeniu w warunkach hodowlanych, zależy nie tylko od metodyki pobrania materiału i jego czystości mikrobiologicznej, ale również od prowadzenia prawidłowej kontroli stabilności fenotypowej i genetycznej komórek w hodowli zgodnie z zasadami ustanowionymi przez ISCT.

Przed wykonaniem transplantacji należy rozważyć źródło, z jakiego będą wyizolowane komórki mezenchymalne oraz cel jaki zamierzamy osiągnąć. W zależności od tego wyboru, komórki choć spełniające minimalne kryteria ISCT, będą się między sobą różniły właściwościami terapeutycznymi i immunogennymi. Na tą decyzję ma wpływ również liczba komórek jaką można pozyskać przy jednorazowej izolacji i inwazyjność samego zabiegu pobrania. Przykładowo w szpiku kostnym liczba MSC jest bardzo ograniczona i wynosi około 0,01% wszystkich komórek. Natomiast w populacji komórek jednojądrzastych otrzymywanych z 1 grama tkanki tłuszczowej można pozyskać 5×10^3 ADSC, natomiast w przypadku stromalnych komórek mezenchymalnych z galarety Whartona ich liczba wynosi ponad $1-5 \times 10^4$ /cm sznura pępowiny, czyli wielokrotnie więcej w porównaniu do reszty wymienionych źródeł (Kalaszczynska i Ferdyn, 2015). Ponadto w badaniach porównawczych, jak już wspomniano wcześniej, wykazano, że komórki pochodzące z galarety Whartona posiadają największy potencjał proliferacyjny w porównaniu do komórek ze szpiku kostnego, czy tkanki tłuszczowej. Istotna jest też ich całkowicie nieinwazyjna procedura pozyskiwania. Na właściwości MSC wpływ ma również sposób izolacji. Wykazano, że komórki mezenchymalne pochodzące z galarety Whartona izolowane mechanicznie cechowały się wyższym potencjałem proliferacyjnym i wolniej zachodził u nich proces starzenia, w porównaniu do łatwiejszej i bardziej wydajnej izolacji

enzymatycznej (Lech i in., 2016). Co szczególnie istotne, w przypadku terapii tkanek OUN, WJ-MSC izolowane mechanicznie wykazywały również wyższą spontaniczną ekspresję markerów neuralnych nestyny, GFAP, NF200 i β tubuliny III (Lech i in., 2016).

Kolejnym argumentem przemawiającym za stosowaniem galarety Whartona jako źródła komórek mezenchymalnych jest fakt, że jako komórki pochodzące z poptodu (a więc tkanki *de facto* pochodzenia płodowego) cechują się mniej zróżnicowanym fenotypem i rozszerzonym potencjałem do indukcji różnicowania w 3 podstawowe linie gastrulacyjne (ang. triploblastic lineage cells), czego odzwierciedleniem jest ekspresja markerów pluripotencjalnych komórek embrionalnych ESC: Oct4, SSEA-4, Nanog, Sox-2 (Kalaszczynska i Ferdyn, 2015; Maslova, Novak i Kruzliak, 2015). Co więcej, WJ-MSC wykazują się niską immunogennością co prawdopodobnie jest związane z niską ekspresją MHC-I oraz brakiem ekspresji MHC-II, CD40, CD80 i CD86. W licznych badaniach potwierdza się również ich właściwości immunosupresyjne wynikające z wydzielania czynników przeciwzapalnych, m. in.:IDO i PGE2. Ponadto wykazano, że WJ-MSC ekspresjonują HLA-G6 (ang. human leukocyte antigen G6), którego występowanie w surowicy wiąże się ze zmniejszoną częstotliwością odrzucania przeszczepu. Dzięki tym właściwościom nie zaleca się wykonywania testu zgodności tkankowej przed allo-transplantacją tych komórek ani stosowania po-transplantacyjnej immunosupresji (Kalaszczynska i Ferdyn, 2015) (Bang, Kim, Cha i Moon, 2016).

W aspekcie regeneracji mózgu niezwykle istotne są specyficzne cechy/predyspozycje MSC do różnicowania w linie komórkowe będące składowymi jednostkami neuronaczyniowej. Wraz z różnicowaniem, specyfikacji mogą ulegać również wydzielane przez nie czynniki o zróżnicowanych działaniach neuro- bądź angio-gennych. W badaniach porównawczych WJ-MSC, BM-MSC i ADSC wykazano, że komórki pochodzące z galarety Whartona, poza wspomnianą spontaniczną ekspresją markerów neuralnych, wydzielają szereg neuroprotektynnych, angiogennych, neurogennych i regeneracyjnych czynników, takich jak: NTF3, EGF, MDK, HBEGF, CXCL2, CXCL5, FGF9, VEGF, TGF- β , FGF-2. W przypadku komórek pochodzących ze szpiku kostnego lub tkanki tłuszczowej czynniki te były obecne na znacząco niższym poziomie lub w ogóle się nie pojawiały (Maslova, Novak i Kruzliak, 2015; Kalaszczynska i Ferdyn, 2015). Tak jak o tym wspomniano, wykazano że WJ-MSC i inne płodowe komórki mezenchymalne są szczególnie predysponowane do różnicowania w kierunku neuronów, komórek glijowych czy też śródbłonna (Li i in., 2016a). Różnicowanie proneuralne MSC *in vitro* daje szansę na szybsze ich wbudowanie w uszkodzoną tkankę, zastąpienie zdegenerowanych komórek oraz zwiększenie wydzielania czynników neuro- i angiogennych. W części badań opisywany był również zwiększony potencjał mielinizacyjny, migracyjny i wyższa przeżywalność przeszczepu w mózgu w wyniku różnicowania neuralnego. Wykazywano również zmniejszenie deficytów neurologicznych po transplantacji MSC różnicowanych w komórki należące do jednostki neuronaczyniowej (Fairbairn i in., 2015).

Jedną z istotniejszych kwestii praktycznych jest podanie odpowiedniej liczby mezenchymalnych komórek macierzystych. W większości przeprowadzanych badań klinicznych podaje się 1×10^6 komórek/kg m.c. Jednak w wyniku serii doświadczeń *in vivo* na chomikach przeprowadzonych przez Mastro i wsp. (2012) ustalono, że chociaż minimalna efektywna dawka przeszczepianych komórek wynosi 1×10^6 komórek/kg m.c., najlepsze efekty terapeutyczne obserwuje się przy podaniu 40×10^6 komórek/kg m.c. Przy przeliczeniu na dorosłego człowieka o wadze 70 kg wynosiłoby to aż $2,8 \times 10^9$ komórek, co wydaje się nierealne z różnych względów.

Dlatego też, tak istotne jest zwiększenie efektywności komórek mezenchymalnych (Mastri, Lin i Lee, 2014) poprzez wydłużenie czasu ich przeżycia po przeszczepie, usprawnienie wbudowywania się w uszkodzoną tkankę i stymulacji istotnych terapeutycznie funkcji takich jak np. zdolność do ukierunkowanej migracji i zwiększonego wydzielania istotnych terapeutycznie czynników.

Wydaje się, że można to uzyskać poprzez przed-transplantacyjne oddziaływania na komórki w czasie hodowli *in vitro*. Zastosowanie obniżonego stężenia tlenu w hodowli wpływa pozytywnie na cechy fenotypowe komórek. Szereg badań wykazuje że zastosowanie 3-10% O₂ a nawet zbliżonego do warunków jamy szpikowej 0,1-2% stężenia tlenu, działa stymulująco na potencjał proliferacyjny komórek mezenchymalnych oraz hamuje procesy ich starzenia w czasie hodowli (Drela i in., 2014). Co więcej w badaniach Rosova i wsp. (2008) wykazano, że w wyniku inkubacji komórek mezenchymalnych w warunkach obniżonego stężenia tlenu zwiększyły się ich zdolności regeneracyjne oraz przeżywalność również po przeszczepie *in vivo* (Rosová i in., 2008; Drela i in., 2014). Z drugiej strony wykazano, że warunki takie działają stymulująco na różnicowanie MSC w kierunku śródbłonna, na wydzielanie SDF-1 oraz ekspresję CXCR4 i CX3CR1 na powierzchni komórek macierzystych (Chen i in., 2009; Mastri, Lin i Lee, 2014).

Zwiększenie przeżywalności komórek mezenchymalnych po przeszczepie u ludzi można osiągnąć również dzięki optymalizacji mediów hodowlanych i zastosowania ludzkiego lizatu płytkowego lub osocza zamiast używanego klasycznie, ksenogenicznego serum bydlęcego, które może wpływać na właściwości immunogenne MSC. Co ciekawe wykazano, że zastosowanie w hodowli MSC ludzkiego osocza pobranego w ciągu kilku godzin od wystąpienia pierwszych objawów udaru niedokrwinnego wpływa stymulująco na proliferację i wydzielanie szeregu czynników neuro-/angiogennych i immunomodulacyjnych (Bang i in., 2016).

Stosowanie rozmaitych rusztowań wspomagających (ang. scaffolds) jest kolejną strategią mającą na celu wydłużenie przeżywalności transplantowanych komórek w organizmie biorcy. Idealne rusztowanie, poza ochronnym działaniem na komórki, powinno również samo z siebie wpływać stymulująco na regenerację uszkodzonej tkanki. Badaniom są poddawane rusztowania zbudowane z chitosanu, alginianu, kwasu hialuronowego, glikolu polietylenowego, fibryny i innych (Fairbairn i in., 2015). Jednak na szczególną uwagę zasługuje lizat płytkowy, wykorzystany w prezentowanej tutaj pracy. W badaniach przeprowadzonych przez Yael Hayon (2012 i 2013) wykazano, że lizat płytkowy podany do komór bocznych, wykazywał działanie neuro- i angiogenne zarówno w strefie okołokomorowej jak i w miejscu uszkodzenia wywołanego trwałym zamknięciem tętnicy środkowej mózgu szczura (Hayon i in., 2013, 2012a). Ponadto poprawie ulegały funkcje motoryczne, a wielkość uszkodzenia była istotnie mniejsza w porównaniu do nietraktowanej komórkami lezji kontrolnej. W innej pracy tej samej grupy wykazano pozytywny wpływ lizatu płytkowego na proliferację, przeżywalność i różnicowanie neuralnych komórek macierzystych *in vitro* (Hayon i in., 2012b). Połączenie właściwości mezenchymalnych komórek macierzystych z lizatem płytkowym może skutkować wzmocnionymi efektami terapeutycznymi. Ponadto zastosowanie transplantów z rusztowaniami 3D może naśladować warunki panujące w mózgu i promować wzrost i przeżycie przeszczepu, a jednocześnie sprzyjać migracji i zasiedlaniu przez endogenne komórki regeneracyjne (Fairbairn i in., 2015).

Innymi metodami na zwiększenie efektywności terapeutycznej komórek mezenchymalnych jest ich przed-transplantacyjna stymulacja czynnikami wzrostowymi lub chemicznymi takimi jak np. antyoksydanty. W licznych przedklinicznych badaniach *in vivo* wykazano, że w wyniku preinkubacji komórek MSC w mediach zawierających czynniki wzrostowe (np. BDNF, VEGF, HGF) lub chemiczne stymulatory wzrostu i odnowy tych komórek (np. kwas walproinowy, czy lit) dochodzi do zwiększenia migracji i wydzielania czynników troficzných po transplantacji MSC do uszkodzonego mózgu (Bang i in., 2016). W innych badaniach na skutek preinkubacji *in vitro* komórek mezenchymalnych z FGF-2, IGF-1 czy BMP-2, transplanowane komórki wykazywały zwiększoną przeżywalność i właściwości regeneracyjne (Mastri, Lin i Lee, 2014). Część badaczy uważa, że komórki mezenchymalne reagują dynamicznie na warunki środowiska w wyniku stymulacji pojawiającymi się tu ligandami receptorów Toll-podobnych, co wpływa na zmianę ich fenotypu na prozapalny (M1-aktywacja TLR4) lub immunosupresyjny (M2-aktywacja TLR3), które różnią się zasadniczo swoim spektrum oddziaływań parakrynych (Mastri i in., 2012; Waterman, Tomchuck, Henkle i Betancourt, 2010; Kota i in., 2014). Wykazano, że w wyniku aktywacji receptora TLR3 dochodzi do zwiększenia sekrecji immunomodulacyjnych interleukin IL-6, IL-11, IL-10, czynnika przeżycia komórek macierzystych LIF oraz aktywacji ścieżki sygnałowej IL-6/JAK/STAT3 znacząco aktywującej pro-regeneracyjny ciąg sygnałowy poprzez zwiększenie ekspresji SDF1, VEGF i HGF (Mastri, Lin i Lee, 2014).

Dodatkowo, określone modyfikacje składu chemicznego mediów hodowlanych przez wprowadzenie do nich farmakologicznie czynnych związków drobnocząsteczkowych, może wpływać na uodpornienie przeszczepianych komórek na szkodliwe warunki środowiskowe np. poprzez wzmocnienie ich potencjału antyoksydacyjnego lub aktywności systemów transportowych i enzymatycznych odpowiedzialnych za wprowadzenie do komórek niektórych cytoprotekcyjnych metabolitów.

Innym problemem związanym z systemowym podawaniem komórek macierzystych do terapii OUN jest ich niespecyficzne wychwytywanie przez narządy obwodowe filtrujące krew. Rozwiązaniem może tu być dotętnicze (do tętnic szyjnych), domózgowe lub donosowe podanie przeszczepianych komórek w bliskości anatomicznej do obszaru objętego uszkodzeniem. Niestety tego typu podanie, szczególnie do tętnic szyjnych, może komplikować się wystąpieniem niedrożności naczyń powodującej „mini” udary mózgu (Fukuda i in., 2015). Natomiast w kilku badaniach klinicznych, w których MSC podano donosowo nie stwierdzono dodatkowych powikłań i zaobserwowano częściową poprawę funkcjonalną oraz zwiększoną regenerację neuronacyniową (Wei i in., 2015). Podanie to wykonuje się w mało inwazyjny i stosunkowo prosty sposób. W celu zwiększenia infiltracji komórek MSC do miejsca uszkodzenia można użyć leków zwiększających przepuszczalność bariery krew-mózg np. mannitolu. W badaniu klinicznym jednoczesne podanie mezenchymalnych komórek macierzystych z mannitolem skutkowało zwiększonym poziomem czynników troficzných w uszkodzonym niedokrwieniem mózgu (Bang i in., 2016).

Zaburzenia niedokrwienne mózgu powodują złożoną i długotrwałą dysfunkcję w oddziaływaniu między neuronami, glijem i elementami strukturalnymi naczyń krwionośnych w obrębie całej jednostki neuronaczyniowej. Są one generowane w odpowiedzi na nagłe wystąpienie głębokiego deficytu energetycznego tkanki wywołanego brakiem dopływu głównych substratów metabolicznych, tlenu i glukozy, do komórek. Charakter i głębokość występujących uszkodzeń przesądza o możliwości regeneracji mózgu po niedokrwieniu i obejmuje również całą sieć neuronaczyniową. Pomimo aktywacji procesów miejscowej neuro- i angiogenezy, stopień tej endogennej regeneracji jak również stosowane leczenie farmakologiczne, często nie są wystarczające do zniwelowania skutków uszkodzenia.

Terapia regeneracyjna z zastosowaniem mezenchymalnych komórek macierzystych w celu zmniejszenia lub odtworzenia uszkodzonych struktur OUN jest od lat w centrum zainteresowania wielu środowisk medycznych i naukowych. Chociaż dotychczasowe badania kliniczne wykazały bezpieczeństwo stosowania terapeutycznego MSC, to osiągnięte efekty są stosunkowo nieznaczące. Z tego względu istnieje potrzeba opracowania sposobów zwiększających potencjał regeneracyjny tej terapii opartej na działaniu komórek macierzystych.

Podstawowym celem podjętych badań była ocena naczynio- i neuro-protekcijnego wpływu mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z ludzkiej galarety Whartona (WJ-MSC) oraz wyprowadzonych z nich progenitorów śródbłonkowych (WJ-EPC) na uszkodzony niedokrwieniem mózg szczura.

Pracę podzielono na trzy etapy: *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*. W badaniach zastosowano ogólnie akceptowany model organotypowej hodowli skrawków hipokampa czasowo pozbawionych glukozy i tlenu (Sarnowska, 2002) oraz model niedokrwienia mózgu szczura indukowany ouabainą (Janowski i in., 2008). Do realizacji podstawowego celu pracy zaplanowano następujące cele szczegółowe.

Etap *in vitro*:

1. Charakterystyka WJ-MSC oraz ocena ich zdolności do indukowanego różnicowania się w kierunku progenitorów śródbłonkowych, w tym:
 - a) charakterystyka morfologiczna i fenotypowa WJ-MSC oraz ocena zdolności tych komórek do różnicowania w kierunku mezodermalnym;
 - b) ocena efektywności różnicowania śródbłonkowego WJ-MSC: charakterystyka wzrostu, analiza morfologiczna i fenotypowa oraz weryfikacja funkcjonalnych cech śródbłonkowych.
2. Porównawcza ocena ekspresji IL-6, VEGF i TGF- β 1 oraz receptorów TLR3 i TLR4 w WJ-MSC i WJ-EPC.
3. Analiza wpływu stymulacji TLR3/4 na wydzielanie IL-6, VEGF i TGF- β 1 przez WJ-MSC i WJ-EPC.

Etap *ex vivo*:

1. Porównanie wpływu WJ-MSC i WJ-EPC na sieć naczyniową oraz żywotność neuronów w szczególnie wrażliwym na niedokrwienie regionie CA1 hipokampa w organotypowym modelu hodowli skrawków hipokampa po czasowym pozbawieniu glukozy i tlenu.

Etap *in vivo*:

1. Analiza porównawcza oddziaływania przeszczepionych WJ-MSC lub WJ-EPC na uszkodzony niedokrwieniem mózg szczura, w tym:

a) Immunohistochemiczna i morfometryczna charakterystyka działania naczynioprotekcyjnego i angiogenego WJ-MSC i WJ-EPC;

b) Określenie właściwości przeciwzapalnych i hamowania tworzenia blizny glejowej poprzez morfometryczną ocenę lokalnej komórkowości w reakcji z przeciwciałami skierowanymi przeciwko ED1 i GFAP.

Otrzymane wyniki posłużą do oceny potencjału neuro- i angio-genego oraz neuro- i naczynio-protekcijnego komórek MSC pochodzących z galarety Whartona w uszkodzeniach niedokrwieniowych mózgu.

3. MATERIAŁ

3.1. Mezenchymalne komórki macierzyste

Przedmiotem badań były mezenchymalne komórki macierzyste, pochodzące z galarety Whartona (**WJ-MSC**). Materiałem wyjściowym do wyprowadzenia hodowli pierwotnej WJ-MSC, była ludzka pępowina (20 cm) pobrana bezpośrednio po porodzie, po uzyskaniu zaaprobowanej przez Komisję Bioetyczną przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym świadomej zgody pacjentki.

Sznur pępowiny po porodzie był umieszczany w roztworze PBS (ang. Phosphate Buffered Saline, buforowany roztwór soli, Gibco) z dodatkiem antybiotyków AAS (penicylina 10000 U/mL, streptomycyna 10000 µg/mL i amfoterycyna B 25 µg/mL; ang. Antibiotic Antimycotic Solution, Gibco) w proporcji 1:100. Po szeregu płukań w PBS + AAS, sznur był cięty na 2-3 mm plastry, a następnie przy pomocy sztancy biopsyjnych (∅ 2 i 3 mm) wycinano walcowate fragmenty galarety Whartona z pominięciem naczyń krwionośnych. Uzyskane eksplanty (ok. 20-30 skrawków) przenoszono pipetą Pasteura do butelek hodowlanych o powierzchni 25 cm², uzupełnionych uprzednio 1,5 mL pożywką przeznaczoną dla ludzkich komórek mezenchymalnych (Lonza, MSCGM Bullet kit).

Komercyjną hodowlę pierwotną mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego (**BM-MSC**) pozyskano z firmy Lonza, na etapie drugiego pasażu. Komórki te służyły jako próba pozytywna w eksperymencie porównującym ekspresję receptorów Toll-podobnych TLR3 i TLR4 w WJ-MSC i WJ-EPC.

Hodowlę prowadzono w warunkach obniżonego stężenia tlenu (5% O₂, 5% CO₂, wilgotność 95%, temperatura 37°C) przez 10-14 dni, aż do uzyskania przylegających do podłoża mezenchymalnych komórek macierzystych. Po uzyskaniu konfluencji na poziomie 70-80%, skrawki pępowiny usunięto, a komórki poddano pasażowi. W celu utrzymania dobrej kondycji i stałego poziomu proliferacji, pożywka była zmieniana co 2-3 dni, a po osiągnięciu 70-80% konfluencji komórki pasażowano do nowych naczyń hodowlanych w gęstości 3x10³ komórek/cm². Świeże WJ-MSC od 2 do 4 pasażu pobierano do dalszych eksperymentów lub zamrażano do późniejszych badań.

3.2. Zwierzęta doświadczalne

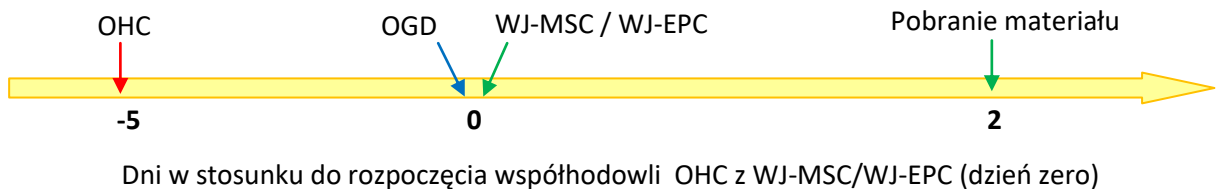
Badania *ex vivo* i *in vivo* były przeprowadzone z wykorzystaniem szczurów szczepu Wistar, wywodzących się z hodowli z Charles River Sulzfeld, hodowanych w zwierzętarni Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego. W doświadczeniach *ex vivo* do pobrania hipokampów wykorzystano 7 – dniowe oseski oddzielane od matek bezpośrednio przed izolacją. Natomiast do doświadczeń *in vivo* wybierane były samce w wieku 3 miesięcy, o wadze 250-280g. Między operacjami zwierzęta przebywały w klatkach hodowlanych w fotoperiodzie 12:12 oraz miały nieprzerwany dostęp do pożywienia i wody. Wszystkie procedury odbywały się zgodnie z wytycznymi Unii Europejskiej i zostały zatwierdzone przez I Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach (zezwolenie nr 62/2015).

3.3. Grupy badane

Poszczególne eksperymenty można podzielić na dwie fazy: *ex vivo* i *in vivo*. W grupie *ex vivo* grupy eksperymentalne stanowiły organotypowe skrawki hipokampa (OHC) (Ryc. 5.), a w fazie *in vivo* były to szczury poddane uszkodzeniu mózgu przez ouabainę (OUA, model uszkodzenia niedokrwiennego mózgu), które otrzymywały przeszczep komórek na rusztowaniach z lizatu płytkowego (LP) (Ryc. 6.).

Ex vivo:

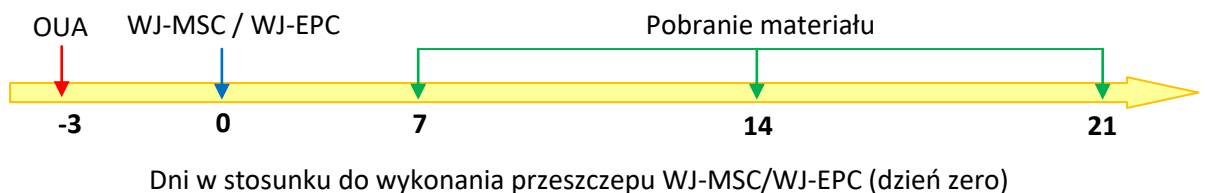
- grupa I – OHC (kontrola)
- grupa II – OHC współhodowane z komórkami WJ-MSC
- grupa III – OHC współhodowane z komórkami WJ-EPC
- grupa IV – OHC uszkodzone poprzez czasowe pozbawienie glukozy i tlenu (OGD) (kontrola)
- grupa V – OHC OGD współhodowane z komórkami WJ-MSC
- grupa VI – OHC OGD współhodowane z komórkami WJ-EPC



Ryc. 5. Schemat przeprowadzanych doświadczeń *ex vivo*. Współhodowlę OHC z komórkami rozpoczęto bezpośrednio po wykonaniu OGD. (OHC – izolacja skrawków organotypowych hipokampa; OGD – czasowe pozbawienie glukozy i tlenu OHC; WJ-MSC/WJ-EPC – współhodowla OHC z komórkami WJ-MSC lub WJ-EPC).

In vivo:

- grupa A – szczury po transplatacji LP
- grupa B – szczury po transplatacji WJ-MSC + LP
- grupa C – szczury po transplatacji WJ-EPC + LP



Ryc. 6. Schemat przeprowadzanych doświadczeń *in vivo* (OUA- uszkodzenie mózgu szczura ouabainą; WJ-MSC/WJ-EPC – przeszczep komórek).

4. METODY BADAŃ

4.1. Hodowla komórek WJ-MSC i BM-MSC

Komórki WJ-MSC hodowano w komercyjnej pożywce wzrostowej dla komórek mezenchymalnych (MSCGM BulletKit™ Medium, Lonza). Hodowlę prowadzono w warunkach obniżonego stężenia tlenu (5% O₂, 5% CO₂, wilgotność 95%, temperatura 37°C). W celu utrzymania dobrej kondycji komórek pożywka była zmieniana co 2-3 dni, a pasażę były przeprowadzane po uzyskaniu 70-85% konfluencji. Pasażowane komórki wysiewane były w gęstości 3-5x10³ komórek/cm², a następnie pobierane do dalszych eksperymentów.

Komórki mezenchymalne pochodzące ze szpiku kostnego (BM-MSC), hodowano w pożywce MSCGM w identyczny sposób jak WJ-MSC. Po osiągnięciu 70-85% komórki pobierano do analizy molekularnej receptorów Toll-podobnych.

4.2. Różnicowanie WJ-MSC w kierunku komórek mezodermy (adipocyty, osteocyty, chondrocyty)

Po 30 dniach hodowli WJ-MSC w pożywce MSCGM (5% O₂, 5% CO₂, wilgotność 95%, temperatura 37°C) po osiągnięciu ok. 70-85% konfluencji, komórki odczepiono od powierzchni naczynka hodowlanego, a następnie policzono w komorze Bürkera. Różnicowanie WJ-MSC w kierunku adipocytów, osteocytów i chondrocytów wykonano według Tabeli 3.

Tabela 3. Różnicowanie WJ-MSC w kierunku komórek mezodermy

	Adipogeneza	Osteogeneza	Chondrogeneza
Początkowa gęstość WJ-MSC	1x10 ⁴ komórek/cm ²	5x10 ³ komórek/cm ²	5x10 ⁵ komórek/5μl mikromasy
Typ hodowli	2D - hodowla zlewna	2D - hodowla zlewna	3D - mikromasa
Pożywka różnicująca	StemPro Adipogenesis Differentiation Kit (Gibco)	StemPro Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco)	Stem Pro Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco)
Czas hodowli	14 dni	21 dni	14 dni

Zróżnicowane komórki po upływie określonego czasu utrwalono w 4% PFA (15 minut, temperatura pokojowa), a następnie przepłukano trzykrotnie roztworem PBS.

W wyniku różnicowania w kierunku adipocytów WJ-MSC wytwarzają krople tłuszczu, które uwidoczniło przy użyciu czerwieni olejowej wiążącej triglicerole. W tym celu utrwaloną hodowlę komórek przez 30 minut płukano wodą destylowaną oraz 60% roztworem izopropanolu, po czym dodano czerwieni olejowej (3 mg/ml w mieszaninie izopropanol/woda 3:2) i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej.

WJ-MSC na skutek inkubacji z pożywką różnicującą w kierunku osteocytów produkują sole wapnia, których obecność jest weryfikowana przy pomocy Alizarin Red S (Sigma-Aldrich). W celu oceny zdolności do różnicowania w kierunku komórek tkanki kostnej, WJ-MSC po utrwaleniu przepłukano wodą dejonizowaną, a następnie inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej z 2% roztworem Alizarin Red S.

Różnicowanie w kierunku komórek tkanki chrzęstnej prowadzono przez 14 dni w tzw. mikromasach, które przygotowano poprzez nakroplenie 5 μ l peletu WJ-MSC na powierzchni naczynka hodowlanego. Po 14 dniach hodowli z pożywką różnicującą, komórki wytwarzają glikozaminoglikany, których obecność była weryfikowana przy pomocy inkubacji z 1% roztworem Alcian blue (Sigma-Aldrich, błękit alcianowy) w 0,1 N HCl (30 minut, temperatura pokojowa).

We wszystkich testach różnicowania wybarwione preparaty wizualizowano i dokumentowano w mikroskopie świetlnym Zeiss Axio Vert 40C. Jako kontrolę negatywną reakcji barwnych wykorzystano WJ-MSC hodowane w standardowej pożywce wzrostowej MSCGM.

4.3. Różnicowanie WJ-MSC w kierunku endotelialnym

WJ-MSC po około 14 dniach wzrostu w pożywce MSCGM w warunkach obniżonego stężenia tlenu (5% O₂, 5% CO₂, wilgotność 95%, temperatura 37°C) i po osiągnięciu około 80% konfluencji, hodowlę WJ-MSC podzielono na dwie części. W pierwszej komórki wysiano w gęstości 3x10³ komórek/cm², a następnie hodowano w pożywce MSCGM. W drugiej z dodatkiem pożywki różnicującej w kierunku śródbłonka (EGM-2, Lonza) hodowano komórki wysiane w gęstości 1x10³ komórek/cm². Indukcja fenotypu śródbłonkowego trwała 7 dni, po tym czasie WJ-EPC i WJ-MSC przeznaczano do dalszych eksperymentów. Od tego momentu komórki różnicowane w kierunku śródbłonka oznaczano jako WJ-EPC, a komórki nieróżnicowane pozostawiono przy pierwotnej nazwie WJ-MSC.

4.4. Obliczanie powierzchni komórek WJ-MSC i WJ-EPC

Komórki WJ-MSC i WJ-EPC hodowano w dedykowanych pożywkach, odpowiednio MSCGM i EGM-2 do drugiego pasażu (DIV=30), do osiągnięcia 60-75% konfluencji. Obserwację oraz zdjęcia wykonywano przyżyciowo przy pomocy Zeiss Axio Vert 40C oraz Zeiss Axio Vert.A1. Powierzchnię komórek liczono z użyciem oprogramowania Zeiss 2012.

4.5. Charakterystyka wzrostu WJ-MSC i WJ-EPC

Charakterystykę proliferacji komórek WJ-MSC i WJ-EPC, wykonano przy pomocy testu z użyciem odczynnika WST-1 (Roche). W teście tym mierzono kolorymetrycznie ilość ciemnoczerwonego formazanu, powstałego w wyniku redukcji jasnoczerwonych soli tetrazolu (WST-1) przez NADH (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy), który jest produkowany przez metabolicznie aktywne komórki (Cytotoxicity WST-1, 2017). Pomiar wykonywano przy pomocy czytnika spektrofotometrycznego FLUOstar Omega (Biogenet). W pierwszym etapie doświadczenia wykonano krzywą kalibracyjną zależności absorbancji ($\lambda = 420$ nm) od gęstości komórek. W drugim etapie, komórki będące na tym samym etapie hodowli (drugi pasaż, DIV=30 dni) wysiano na płytkach 96 - dołkowych w gęstościach: WJ-MSC 1,5x10³ komórek/cm² i WJ-EPC 2,5x10² komórek/cm². Następnego dnia dodawano odczynnik WST-1 w proporcji 1:10 i po 2 godzinach inkubacji (5% O₂, 5% CO₂, wilgotność 95%, temperatura 37°C) wykonywano pomiar absorbancji przy długości fali 420 nm. Charakterystykę wzrostu komórek prowadzono codziennie przez 7 dni. Liczbę żywych komórek WJ-MSC lub WJ-EPC w hodowli obliczono na podstawie wartości absorbancji dla krzywej wzorcowej. Liczba podwojeń populacji (Population Doubling Number- PDs), czas

podwojenia populacji (Population Doubling Time- PDT) oraz skumulowana liczba podwojeń populacji CPDs (Cumulative Population Doublings) były liczone według następujących wzorów:

$$PDs = [\ln(N_o/N_i)]/\ln 2;$$

$$PDT = T [\ln(2)]/\ln(N_o/N_i);$$

$$CPDs = PDs_1 + PDs_2 + PDs_3 + \dots + PDs_n, \text{ gdzie}$$

No- liczba komórek otrzymanych, Ni- liczba komórek wysianych, T- czas trwania hodowli (Drela i in., 2014)

4.6. Analiza immunocytochemiczna markerów endotelialnych

W celu określenia fenotypu komórek wykonano szereg reakcji immunocytochemicznych stosując przeciwciała pierwszorzędowe i odpowiadające im przeciwciała drugorzędowe skoniugowane z fluorochromami (Tabela 4.). WJ-MSC i WJ-EPC wysiano na płytkach 24 – dołkowych, w gęstościach: WJ-MSC 3×10^3 komórek/cm² i WJ-EPC 9×10^3 komórek/cm². Po 48 godzinach komórki utrwalano przez 15 minut w roztworze 4% PFA w PBS, a następnie przepłukano komórki trzykrotnie roztworem PBS. W celu wyeliminowania niespecyficznych wiązań inkubowano komórki jednocześnie permeabilizując błony w roztworze 10% surowicy krwi koziej (ang. Goat serum, GS, Gibco) zawierającej 0,2% Triton X-100 (Sigma Aldrich) w PBS przez 1 godzinę w temperaturze 20°C. Reakcje z przeciwciałami pierwszorzędowymi charakterystycznymi dla komórek endotelialnych: PECAM-1 (cząsteczka adhezji komórkowej płytek i śródbłonna, marker wczesnych komórek endotelialnych), vWF (czynnik von Willebrand'a; marker dojrzałych komórek endotelialnych), VCAM-1 (cząsteczka adhezji komórkowej naczyń) i VEGFR-2 (receptor 2 naczyniowo śródbłonkowego czynnika wzrostu) przeprowadzono inkubując komórki w 4°C przez 24 godziny (Tabela 4.). Po odplukaniu przeciwciał pierwszorzędowych roztworem PBS, w celu rozwinięcia reakcji barwnych, komórki inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 20°C z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi skoniugowanymi z fluorochromem Alexa Fluor 488. Jądra komórek barwiono 5µM Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) przez 15 minut. Jako kontrolę negatywną użytych przeciwciał zastosowano powyższą procedurę znakowania z pominięciem pierwszorzędowych przeciwciał. Preparaty analizowano przy pomocy mikroskopu konfokalnego LSM 780 i oprogramowania Zen 2012 (Zeiss).

Tabela 4. Przeciwciała pierwszorzędowe i drugorzędowe użyte w badaniach immunocytochemicznych.

Przeciwciała pierwszorzędowe (Gospodarz)	Izotyp Rozcieńczenie	Firma	Przeciwciała drugorzędowe (Gospodarz)	Rozcieńczenie	Producent
Poliklonalne anty-PECAM-1 (królik)	IgG 1:100	Santa Cruz	Alexa Fluor 488 (kozie) anty-królicze	1:1000	Molecular Probes
Monoklonalne anty-VEGFR-2 (mysz)	IgG1 1:300	Santa Cruz	Alexa Fluor 488 (kozie) anty-mysie	1:1000	Molecular Probes
Poliklonalne anty-VCAM-1 (królik)	IgG 1:100	Santa Cruz	Alexa Fluor 488 (kozie) anty-królicze	1:1000	Molecular Probes

Poliklonalne anty-vWF (królik)	IgG 1:400	Abca m	Alexa Fluor 488 (kozie) anty-królicze	1:1000	Molecular Probes
--------------------------------------	--------------	-----------	------------------------------------------	--------	---------------------

4.7. Analiza cytometryczna markerów mezenchymalnych

Charakterystykę fenotypową komórek wykonano stosując komercyjny zestaw do identyfikacji typowych markerów mezenchymalnych BD Stemflow™ hMSC Analysis Kit (BD Biosciences). WJ-MSC i WJ-EPC na etapie 2 pasażu (DIV=30) oddzielono od powierzchni naczynka hodowlanego przy pomocy akutazy (BD Biosciences), a następnie zawieszono w zimnym buforze przeznaczonym do cytometrii przepływowej (wzmacniającym sygnał fluorescencji) BD Pharmingen w minimalnej gęstości 1×10^5 komórek/ml. Komórki znakowano przez 30 minut, w temperaturze 20°C, przeciwciałami skoniugowanymi z fluorochromami, skierowanymi przeciwko markerom pozytywnym CD90-FITC, CD73-APC, CD105- PerCP-Cy5.5, oraz negatywnym CD34-PE, CD11b-PE, CD19-PE, CD45-PE, HLA-DR-PE. W celu wykluczenia niespecyficznego odczytu i zakłóceń wykonano kontrole izotypowe oraz kompensację dla każdego fluorochromu. Pomiar przeprowadzono przy pomocy FACSCalibur II firmy Becton Dickinson i oprogramowania FACSDiva, analizując 1×10^5 zdarzeń na każdą próbkę. Wyniki przedstawiono jako procent komórek pozytywnych dla poszczególnych markerów w stosunku do kontroli izotypowych, w postaci histogramu.

4.8. Analiza ekspresji genów

Komórki WJ-MSC oraz WJ-EPC na etapie 2. pasażu odklejono od powierzchni naczynka hodowlanego przy pomocy trypsyny, zwirowano (200xg) i poddano trzykrotnemu płukaniu w roztworze PBS. Po zwirowaniu osad zawieszono w odczynniku TRIzol Reagent (Life Technologies), zgodnie z instrukcją producenta. Całkowite RNA wyizolowano według metody Chomczyńskiego (Chomczynski i Sacchi, 1987). Stężenie oraz czystość wyizolowanego kwasu nukleinowego sprawdzono spektrofotometrycznie przy pomocy NanoDrop 2000 (Amersham Pharmacia Biotech), poprzez odczytanie wartości stosunku absorbancji 260nm/280nm i 260nm/230nm. Do dalszych badań wybrano próbki o czystości równej lub nieznacznie odbiegającej od wartości 2. W celu wyeliminowania zanieczyszczeń genomowym DNA, próbki poddano procesowi DNAzowania (Ambion's DNA-free™ DNase Treatment and Removal Reagents; Life Technologies), zgodnie z instrukcją producenta.

Reakcję odwrotnej transkrypcji (RT, ang. Reverse Transcription) przeprowadzono przy pomocy odczynników High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Life technologies) w warunkach zalecanych przez producenta. W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły: 2x RT Buffer (10 µl), 20xRT Enzyme MIX (1 µl), Woda (9 µl – X) oraz RNA (X µl (0,5µg-1 µg)). Całkowita objętość końcowa mieszaniny reakcyjnej wynosiła 20 µl.

Reakcję PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) przeprowadzono w 25 µl objętości mieszaniny zawierającej 1U Taq DNA Polymerase, 400 µM dNTPs i równą ilość cDNA dla każdego genu, z dodatkiem 1 µM starterów w orientacji przedniej (F, forward) i wstecznej (R, reverse) w obecności 1,5 mM MgCl₂. Startery do amplifikacji poszczególnych genów zaprojektowano z użyciem programu primer – BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/>) lub wykorzystano sekwencje dostępne w literaturze. Zaprojektowane startery wykonano w Pracowni

Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki w Warszawie. Produkty PCR poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu na 1,5% żelu agarozowym (Sigma Aldrich) w 0,5x stężonym buforze TBE (0,89M Tris, kwas borowy, 0,02M EDTA, pH8). DNA wyznakowano bromkiem etydyny (0,5 mg/ml), a następnie zwizualizowano w systemie GELDoc firmy BioRad.

W badaniach stosowano również metodę PCR w czasie rzeczywistym (RealTime PCR). Do przeprowadzenia reakcji PCR w czasie rzeczywistym wykorzystano znacznik należący do rodziny asymetrycznych cyjaninowych barwników fluorescencyjnych - SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies). Barwnik ten po połączeniu się z dsDNA daje silny sygnał wprost proporcjonalny do ilości DNA. Reakcję RealTime PCR przeprowadzano w szalkach 96-dołkowych w objętości 20 µL. Dla każdej próby pobierano odpowiednią ilość cDNA uzyskanego po reakcji odwrotnej transkrypcji i uzupełniano wodą wolną od nukleaz do objętości 9 µl. Następnie dodawano primery o orientacji przedniej(F) i wstecznej(R) (Tabela 5.) w objętości po 0,5 µl (50nM) oraz 10 µl znacznika SYBR Green I. Wybrany genem referencyjnym był gen metabolizmu podstawowego dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego (GAPDH). Reakcję PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzano w termocyklerze 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Na podstawie uzyskanych wyników obliczano względny poziom ekspresji poszczególnych markerów w analizowanych komórkach, korzystając z następujących wzorów:

$Ct \text{ genu badanego} - Ct \text{ genu referencyjnego} = \Delta Ct$

$\Delta Ct \text{ próby} - \Delta Ct \text{ kalibratora} = \Delta \Delta Ct$

Wskaźnik: $2^{-\Delta \Delta Ct}$.

Tabela 5. Lista starterów użytych w reakcji R-PCR i reakcji RT-PCR i qPCR

Gen/białko	Wielkość produktu [pz]	Sekwencje primerów
qRT-PCR		
ACTB	120	F: 5¢-GCCAACC GCGAGAAGATGA-3¢ R: 5¢-CATCACGATGCCAGTGGTA-3¢
TLR3	72	F: 5¢-TGGTTGGGCCACCTAGAAGT-3¢ R: 5¢-CCATTCTGGCCTGTGAGTT-3¢
TLR4	148	F: 5¢-TGGAAGTTGAACGAATGGAATGTG-3¢ R: 5¢-ACCAGAACTGCTACAACAGATACT-3¢
VEGF-A	91	F: 5¢-ATGACGAGGGCCTGGAGTGTG-3¢ R: 5¢-CCTATGTGCTGGCCTTGGTGAG-3¢
TGF-b1	101	F: 5¢-CCCAGCATCTGCAAAGCTC-3¢ R: 5¢-GTCAATGTACAGCTGCCGCA-3¢
IL-6	81	F: 5¢-GGTACATCCTCGACGGCATCT-3¢ R: 5¢-GTGCCTCTTTGCTGCTTTTAC-3¢
PECAM-1	141	F: 5¢-ATTGCAGTGGTTATCATCGGAGTG-3¢ R: 5¢-CTCGTTGTTGGAGTTCAGAAGTGG-3¢

vWF	112	F: 5'-AGCTGTCCCCTTGGGTACTT-3' R: 5'-CCACAGGGTAGATGGTGCTT-3'
RT-PCR		
VEGF-A	212	F: 5'-GCAGAATCATCACGAAGTGG-3' R: 5'-GCATGGTGATGTTGGACTCC-3'
VEGFR-2	92	F: 5'-GCAGGGGACAGAGGGACTTG-3' R: 5'-GAGGCCATCGCTGCACTCA-3'
PECAM-1	161	F: 5'-TCCGGATCTATGACTCAGGG-3' R: 5'-ACAGTTGACCCTCACGATCC-3'
vWF	329	F: 5'-AATGTTGTGGGAGATGTTTGC-3' R: 5'-GTGGATATCCACCTCTACTTCAGAC-3'

4.9. Test wychwytu acetylowanych lipoprotein niskiej gęstości

Funkcjonalne zróżnicowanie komórek mezenchymalnych w kierunku endotelialnym potwierdzono przy pomocy Dil-Ac-LDL & LDL Cell Labeling Reagent (Biomedical Technologies Inc, Wielka Brytania). Komórki WJ-EPC po 7 dniach różnicowania oraz służące za kontrolę negatywną WJ-MSC wysiano w gęstościach odpowiednio 9×10^3 komórek/cm² i 3×10^3 komórek/cm². Po 48 godzinach do pożywki dodano 10 µg/ml Dil-Ac-LDL (acetylowana lipoproteina niskiej gęstości znakowana 1,1'-dioctadecyl – 3,3,3',3'-tetrametyl-indokarbocyaniny nadchloranu) i inkubowano przez 4 godziny w warunkach obniżonego stężenia tlenu w 37°C (5% O₂, 5% CO₂, wilgotność 95%). Po tym czasie komórki utrwalono 4% PFA, przepłukano roztworem PBS, a jądra wyznakowano barwnikiem Hoechst 33258. Obserwację inkorporacji LDL prowadzono przy pomocy Zeiss Axio Vert 40C oraz Zeiss Axio Vert.A1

4.10. Test tworzenia sieci (struktur) kapilaropodobnych na zrekonstruowanej błonie podstawnej Matrigel

Zdolność tworzenia struktur kapilaropodobnych wykonano używając macierzy zewnątrzkomórkowej Matrigel (ang. extracellular matrix, ECM, Corning, Stany Zjednoczone) pozyskanej z błony podstawnej mysiego mięsaka Engelbretha-Holma-Swarma (EHS). Matrigel inaczej nazywany zrekonstruowaną błoną podstawną (ang. reconstituted basement membrane, rBM) składa się głównie z lamininy, kolagenu IV, entaktyny, proteoglikanu, siarczanu heparanu oraz licznych czynników wzrostowych (EGF 0.5-1.3 ng/mL, bFGF < 0.1-0.2 pg/mL, NGF < 0.2 ng/mL, PDGF 5-48 pg/mL, IGF-1 11-24 ng/mL i TGF-β 1.7-4.7 ng/mL). Komórki WJ-MSC (DIV=30) po 7 dniach różnicowania w kierunku endotelialnym w pożywce EGM-2 (Lonza) wysiano w gęstości 50×10^3 komórek /cm² na szalki z 2mm warstwą Matrigel. Jako kontrolę potraktowano nieróżnicowane komórki WJ-MSC (DIV=30). Obserwację prowadzono przez 24 godziny w aparacie do wizualizacji żywych komórek (CytoSMARTtm Lonza).

4.11. Stymulacja receptorów Toll-podobnych

W doświadczeniach do stymulacji receptorów Toll-podobnych wykorzystano komercyjny ultraczysty lipopolisacharyd (LPS) pozyskany z *E. coli* szczep 0111:B4 (InvivoGen, Warszawa, Polska), będący agonistą TLR4 oraz syntetyczny dwuniciowy RNA (dsRNA) Poli(I:C) (Tocris, Abingdon, Wielka Brytania), który jest agonistą TLR3. Komórki o ustalonych fenotypach WJ-MSC i WJ-EPC po osiągnięciu 70-80% konfluencji przenoszono do obojętnego medium (Neurobasal, 10 mM HEPES, 25% HBSS, 2 mmol/L l-glutamina, 5 mg/mL glukoza, 0.4% penicylina–streptomycyna oraz suplementy N2 (1:10; Gibco) i B27 (1:100; Gibco) z dodatkiem agonistów TLR3- Poly(I:C) (10 µl/ml i 1 µl/ml) lub TLR4- LPS (10 ng/ml i 50 ng/ml), inkubowano przez 24 godziny, a następnie zebrano i zamrożono w temperaturze -80°C.

4.12. Ocena właściwości parakrynych komórek WJ-MSC i WJ-EPC

Analizę czynników wzrostowych i interleukin wydzielanych do pożywki przez WJ-MSC i WJ-EPC, wykonano używając zestawów BD CBA Flex Set, według protokołu producenta (BD Biosciences). Oceniano sekrecję przeciwzapalnego, angiogennego i stymulującego migrację komórek TGF-β1, immunomodulacyjnej, angiogennej i antyapoptotycznej IL-6 oraz czynnika o najszerszym spektrum działania immunomodulacyjnego, angiogennego, nurogenego, antyapoptotycznego i stymulującego migrację komórkową VEGF. Po 24 godzinach hodowli WJ-MSC i WJ-EPC pożywkę zebrano i zbadano cytometrycznie pod kątem analizy ilościowej powyższych czynników. Porównywane ze sobą populacje WJ-MSC i WJ-EPC były na tym samym etapie hodowli drugiego pasażu. Średnie stężenia wyliczono na podstawie pomiaru ok. 200 zdarzeń dla każdego z wybranych czynników. Analizę przeprowadzono na cytometrze FACSCalibur II przy pomocy programu FCAP Array (BD Biosciences). Przetestowano następujące warianty doświadczalne:

- | | |
|-------------------------------|-------------------------------|
| - WJ-MSC | - WJ-EPC |
| - WJ-MSC + Poly(I:C) 10 µg/ml | - WJ-EPC + Poly(I:C) 10 µg/ml |
| - WJ-MSC + Poly(I:C) 1 µg/ml | - WJ-EPC + Poly(I:C) 1 µg/ml |
| - WJ-MSC + LPS 10 ng/ml | - WJ-EPC + LPS 10 ng/ml |
| - WJ-MSC + LPS 50 ng/ml | - WJ-EPC + LPS 50 ng/ml |

4.13. Hodowla organotypowa skrawków hipokampa

Organotypowe skrawki hipokampa pozyskano od 7 dniowych szczurów ze stada Wistar według procedury opisanej przez Sarnowska i wsp. 2009 (Sarnowska i in., 2009). Oseski szczurze przed dekapitacją wprowadzono przez 5 minut w stan hipotermii na lodzie. Wyizolowane hipokampy cięto za pomocą noża McIlwain'a na skrawki o grubości 400 µm. Wszystkie procedury wykonywane były na lodzie. Świeżo wyizolowane skrawki umieszczano na membranach do hodowli organotypowych (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) w płytkach 6-dołkowych, po 4 skrawki na membranę. Początkowo skrawki znajdowały się w pożywce surowiczej (pH 7.2, 50% DMEM, 10 mM HEPES, 25% HBSS, 25% surowica końska (Gibco), 2 mmol/L l-glutamina, 5 mg/mL glukoza, 0.4% penicylina–streptomycyna), po czym stężenie surowicy zmniejszono, stosując dotychczasową pożywkę i nową niezawierającą surowicy (Neurobasal, 10 mM HEPES, 25% HBSS, 2 mmol/L l-glutamina, 5 mg/mL glukoza, 0.4% penicylina–streptomycyna, suplement N2 (1:10; Gibco) i B27

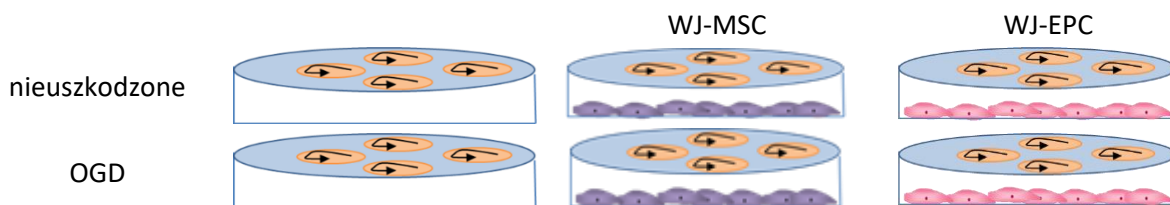
(1:100; Gibco)). Od czwartego dnia hodowlę prowadzono bez obecności surowicy. Skrawki inkubowano w temperaturze 34°C i wilgotności 90% oraz 21% O₂ i 5% CO₂.

4.14. Eksperymentalny model ischemicznego uszkodzenia skrawków hipokampa

W piątym dniu hodowli skrawki hipokampa poddano krótkotrwałej inkubacji w warunkach pozbawienia glukozy i tlenu (ang. Oxygen- Glucose Deprivation, OGD). W tym celu zastąpiono pożywkę odtlenowaną (10 minut, 95% N₂/ 5% CO₂) roztworem Ringera z dodatkiem 10mM mannitolu i wstawiono płytki ze skrawkami do komory beztlenowej. W celu wykluczenia uszkodzonych skrawków 1 godzinę przed eksperymentem znakowano skrawki hipokampa jodkiem propidyny (IP, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Niemcy). Inkubację w warunkach pozbawienia glukozy i tlenu prowadzono przez 30 minut w temperaturze 34°C. Następnie membrany ze skrawkami przekładano do płytek ze standardową pożywką bezsurowiczą i dalszą hodowlę prowadzono przez 24 lub 48 godzin w temperaturze 34°C i wilgotności 90% oraz 21% O₂ i 5% CO₂.

4.15. Wspóhodowla organotypowych skrawków hipokampa z komórkami WJ-MSC i WJ-EPC

WJ-MSC lub WJ-EPC na etapie drugiego pasażu (DIV=30) wysiewano na szalki 6-dołkowe w gęstości odpowiednio 3x10³ komórek/cm² i 9x10³ komórek/cm² (Ryc. 7.). Po osiągnięciu przez komórki 70-80% konfluencji, bezpośrednio przed rozpoczęciem współhodowli usuwano pożywkę wzrostową, płukano przy pomocy PBS, a następnie uzupełniano 1 ml pożywki bezsurowiczej do hodowli OHC. Pięciodniowe skrawki hipokampa przenoszono na membranach do szalek z komórkami i inkubowano przez 24 lub 48 godzin, według następującego schematu:



Ryc. 7. Schemat przedstawiający warianty doświadczeń w badaniach *ex vivo*. Nieuszkodzone lub poddane czasowej inkubacji w warunkach pozbawienia glukozy i tlenu (OGD) organotypowe skrawki hipokampa (beż) umiejscowione na membranach współhodowano z komórkami WJ-MSC (fiolet) lub WJ-EPC (róż) przylegającymi do dna naczynia hodowlanego.

4.16. Ocena przeżywalności komórek piramidowych w regionie CA1 i CA2/3 hipokampa

Do oceny morfometrycznej przeżycia komórek w regionie CA1 oraz CA2/3 hipokampa zastosowano przeżyciowe barwienie jodkiem propidyny, który interkaluje z helisą DNA i przenika tylko przez uszkodzone błony komórkowe. Do nieutrwalonych skrawków organotypowych dodawano 1,4 µg/ml IP, a następnie inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 34°C. Następnie zmieniano pożywkę na świeżą i obserwowano przeżyciowo liczbę komórek wyznakowanych IP w regionach CA1 i CA2/3 hipokampa. Analizę i wizualizację wykonywano przy pomocy mikroskopu LSM 780

i oprogramowania Zen 2012 (Zeiss). Warianty doświadczalne oceny przeżycia komórek w regionach CA1 i CA2/3 hipokampa były następujące:

- organotypowe skrawki hipokampa;
- organotypowe skrawki hipokampa po OGD;
- organotypowe skrawki hipokampa po OGD i współhodowli z WJ-MSC;
- organotypowe skrawki hipokampa po OGD i współhodowli z WJ-EPC.

4.17. Analiza immunohistochemiczna organotypowych skrawków hipokampa

W celu oceny gęstości sieci naczyń krwionośnych w regionie CA1 i CA2/3 hipokampa wykonano badania metodą immunohistochemiczną. Skrawki hipokampa utrwalano przez 30 minut w 4% PFA, a następnie trzykrotnie przepłukano roztworem PBS i blokowano mieszaniną 10% GS i 0,25% Tritonu przez godzinę. Inkubację z pierwszorzędowym przeciwciałem skierowanym przeciwko szczurczemu endotelium RECA-1 (Tabela 6.) prowadzono w mieszaninie permeabilizująco-blokującej (10% GS i 0,25% Triton) w 4°C przez noc. Po tym czasie skrawki ponownie płukano w roztworze PBS i inkubowano przez 1 godzinę z kozim anty-mysim przeciwciałem drugorzędowym Alexa Fluor 546. Jądra komórkowe znakowano przez 15 minut w temperaturze pokojowej przy pomocy Hoechst 33258. Preparaty wizualizowano przy pomocy mikroskopu LSM 780 (Zeiss). Powierzchnię naczyń krwionośnych, wyrażoną jako procent powierzchni naczyń krwionośnych w stosunku do powierzchni regionu CA1 lub CA2/3 hipokampa, liczono na podstawie intensywności świecenia, przy pomocy oprogramowania Zen 2012.

Tabela 6. Przeciwciała pierwszorzędowe użyte w badaniach immunohistochemicznych.

Przeciwciała pierwszorzędowe (Gospodarz)	Isotyp Rozcieńczenie	Firma	Przeciwciała drugorzędowe (Gospodarz)	Rozcieńczenie	Producent
Monoklonalne anty-RECA-1 (mysz)	IgG1 1:25	Abcam	Alexa Fluor 488 (kozy) anty-mysie	1:1000	Molecular Probes

4.18. Znakowanie WJ-MSC oraz WJ-EPC barwnikiem fluorescencyjnym CMFDA

W celu wizualizacji przeszczepionych komórek, WJ-MSC i WJ-EPC znakowano znacznikiem fluorescencyjnym CMFDA (ang. 5-chloromethyl-fluorescein-diacetate; Molecular Probes, Warszawa, Polska), wiążącym się z lipidami błon wewnątrzkomórkowych. W wyniku odcięcia grup acylowych przez obecne w komórce esterazy CMFDA staje się barwny. Po osiągnięciu przez hodowle ok. 75-85% konfluencji pożywki hodowlane zastąpiono DMEM/F12 z dodatkiem 1µl 10 mM znacznika CMFDA i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 37°C (5% O₂, 5% CO₂, wilgotność 95%). Następnie komórki trzykrotnie płukano roztworem PBS, oddzielono od powierzchni naczynka hodowlanego przy pomocy trypsyny i zawieszono w gęstości 8x10⁵ komórek w 100 µl 100% ludzkiego lisztu płytkowego.

4.19. Eksperymentalny model uszkodzenia mózgu

Cytotoksyczne uszkodzenie mózgu indukowano przez podanie do prądkowia szczura inhibitora pompy Na^+/K^+ – ouabainy (OUA; Sigma-Aldrich, Warszawa, Polska) (Janowski i in., 2008). Do zabiegu wykorzystywano dorosłe (3 miesięczne) samce stada Wistar o masie 250 g, które poddano znieczuleniu ogólnemu poprzez iniekcję ketaminy (90 mg/kg) oraz ksylazyny (10 mg/kg). Zwierzęta umieszczano w aparacie stereotaktycznym (Stoelting, Kiel, Stany Zjednoczone), golono, przecinano skórę głowy. Po znalezieniu bregmy (punkt odniesienia w płaszczyźnie horyzontalnej) wyznaczano koordynaty ($x=0,5$; $y=4,7$; $z=3,8$) i wykonywano otwór trepanacyjny o średnicy 0,5 cm. Roztwór ouabainy (50nmol) podawano strzykawką Hamiltona z prędkością 1 $\mu\text{l}/\text{min}$. przy pomocy pompy infuzyjnej (Stoelting, Kiel, Stany Zjednoczone). Po iniekcji strzykawka pozostawała w mózgu szczura przez kolejne 3 minuty w celu zapobiegnięcia wstecznemu wypływowi roztworu. Po wyjęciu igły ranę zaszywano trzema szwami nicią chirurgiczną (B. Braun Surgical SA, Rubí, Hiszpania) oraz sklejało klejem do tkanek (Histoacryl; B. Braun Surgical SA). Zwierzętom po zakończeniu operacji podawano 5 mg/kg m.c. enrofloksacyny (Baytril, Bayer, Leverkusen, Niemcy) oraz 4 mg/kg m.c. karprofenu (Rimadyl; Warszawa, Polska).

4.20. Przygotowanie trójwymiarowych rusztowań lizatu płytkowego z WJ-MSC i WJ-EPC

Trójwymiarowe szkielety z wyznakowanymi barwnikiem CMFDA komórkami WJ-EPC lub WJ-MSC tworzone bezpośrednio przed transplantacją do prądkowia mózgu szczura. Do przygotowania szkieletów trójwymiarowych wykorzystywano aktywny czynnik II krzepnięcia – trombinę. Trombina jest glikoproteiną (α_2 -globulina o masie cząsteczkowej 15×10^3 – 3×10^4) o właściwościach proteolitycznych, biorącą udział w przemianie rozpuszczalnego fibrynogenu z lizatu płytkowego w nierozpuszczalną fibrynę. W tym celu do 50 μl lizatu płytkowego z zawieszonymi komórkami dodawano 50 μl trombiny (stężenie końcowe 2 U/ml), a następnie przenoszono do strzykawki (1 ml, BD Biosciences, Warszawa, Polska).

4.21. Transplantacja WJ-MSC lub WJ-EPC osadzonych na rusztowaniach z lizatu płytkowego do mózgu szczura

Dorosłe szczury stada Wistar, poddane 3 dni wcześniej cytotoksycznemu uszkodzeniu mózgu ouabainą, poddano narkozie (90 mg/kg ketaminy, 10 mg/kg ksylazyny). Po umieszczeniu w aparacie stereotaktycznym, usunięto klej do tkanek oraz szwy. Przed transplantacją weryfikowano koordynaty ($x=0,5$; $y=4,7$; $z=3,8$), których punktami odniesienia w płaszczyźnie horyzontalnej była bregma, a następnie przytwierdzano strzykawkę do ramienia pompy infuzyjnej i podawano 50 μl mieszaniny wyznakowanych CMFDA komórek WJ-MSC lub WJ-EPC (2×10^5 komórek/podanie) w lizacie płytkowym z trombiną. Grupę kontrolną stanowiły szczury poddane cytotoksycznemu uszkodzeniu mózgu, którym podawano do prądkowia lizat płytkowy z trombiną bez komórek. Po iniekcji pozostawiano strzykawkę na 3 minuty, żeby zapobiec wstecznemu wypływowi cieczy. Następnie zespalano ranę nićmi chirurgicznymi oraz klejem do tkanek. W celu zmniejszenia bólu oraz prawdopodobieństwa infekcji zwierzętom podawano 5 mg/kg m.c. enrofloksacyny oraz 4 mg/kg m.c. karprofenu. Zwierzęta uśmiercano po 7, 14 i 21 dniach.

4.22. Pobieranie materiału do badań

Szczury 7, 14 lub 21 dni po transplantacji były poddawane narkozie wziewnej mieszaniną 2,5% izofluranu (Aerrane; Baxter, Warszawa, Polska) w O₂/N₂O (30:70, v/v), a następnie dekapitowane. Wyizolowane mózgi przenoszono do suchego lodu a następnie umieszczano w pudełkach do mrożenia i magazynowano w temperaturze -80°C. 24 godziny przed wykonaniem skrawków, mózgi były przenoszone do temperatury -20°C, po czym krojono je przy użyciu kriostatu w płaszczyźnie czołowej na fragmenty o grubości 20 µm i nakładano na szkiełka podstawowe. Przygotowane preparaty przechowywano do dalszych eksperymentów w temperaturze -80°C.

4.23. Analiza immunohistochemiczna

Efekty protekcyjne komórek oceniano w okolicy lezji korowo/prążkowiowej mózgu. Poza CMFDA jako dodatkowy marker komórek ludzkich stosowano specyficzne dla człowieka przeciwciała skierowane przeciwko CD44. Do analizy wpływu egzogennych komórek na badane parametry reakcji poniedokrwiennego mózgu wykonano szereg barwień immunohistochemicznych. Do oceny gęstości naczyń krwionośnych wykorzystywano specyficzne dla szczurzego śródbłonna przeciwciała RECA-1. Działanie przeciwwzapalne komórek WJ-MSK/WJ-EPC zbadano przy pomocy przeciwciała skierowanego przeciwko szczurzym makrofagom (ED1). Komórki aktywne mitotycznie znakowano przeciwciałem Ki67- specyficznym zarówno dla komórek szczurzych jak i ludzkich. Wpływ przepieczonych komórek na tworzenie blizny glejowej został zweryfikowany z wykorzystaniem przeciwciała skierowanego przeciwko ludzkim/szczurzym komórkom glejowym (GFAP). Natomiast potencjał neuralny transplantowanych komórek testowano przy pomocy przeciwciał skierowanych przeciwko nestynie i NF200 (ang. 200 kDa Neurofilament Protein, białko neurofilamentów o masie 200 kDa) (Tabela 7.).

Przed wykonaniem reakcji preparaty były suszone przez 15 minut, a następnie utrwalane roztworem 4% PFA przez 20 min. w temperaturze pokojowej. W celu wyeliminowania niespecyficznego wiązania i permeabilizacji błon preparaty inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej z mieszaniną 10% GS i 0,25% Tritonu. Po trzykrotnym przepłukaniu roztworem PBS, do preparatów dodano przeciwciała pierwszorzędowe zawieszone w powyższej mieszaninie permeabilizująco-blokującej i inkubowano przez noc w temperaturze 4°C. Dla rozwinięcia reakcji barwnych następnego dnia po trzykrotnym przepłukaniu preparatów roztworem PBS dodano odpowiednie przeciwciała drugorzędowe skoniugowane z fluorochromami i inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej. Po tym czasie trzykrotnie płukano preparaty roztworem PBS w celu usunięcia nadmiaru czynnika blokującego oraz stosowanych przeciwciał i wybarwiono jądra komórkowe 5 µM roztworem Hoechst 33258 przez 20 min. w temperaturze pokojowej. Po odpłukaniu roztworem PBS niezwiązanego barwnika, preparaty zamykano przy użyciu Fluorescent Mounting Medium (Dako, Gdynia, Polska). Dla kontroli specyficzności reakcji immunohistochemicznych stosowano te same procedury z pominięciem przeciwciała pierwszorzędowego. Preparaty analizowano przy pomocy mikroskopu LSM 780 i oprogramowania Zen 2012 (Zeiss).

Tabela 7. Przeciwciała pierwszorzędowe i drugorzędowe użyte w badaniach immunohistochemicznych.

Przeciwciała pierwszorzędowe (Gospodarz)	Isotyp Rozcieńczenie	Firma	Przeciwciała drugorzędowe (Gospodarz)	Rozcieńczenie	Producent
Monoklonalne anty-CD44 (mysz)	IgG2a 1:50	Santa Cruz	Alexa Fluor 488 (kozie) anty-mysie	1:500	Molecular Probes
Monoklonalne anty-ED1 (mysz)	IgG1 1:100	Bio-Rad	Alexa Fluor 546 (kozie) anty-mysie	1:500	Molecular Probes
Poliklonalne anty-GFAP (królik)	1:500	Dako	Alexa Fluor 546 (kozie) anty-mysie	1:500	Molecular Probes
Monoklonalne anty-RECA-1 (mysz)	IgG1 1:50	Abcam	Alexa Fluor 546 (kozie) anty-mysie	1:500	Molecular Probes
Poliklonalne anty-Ki67 (królik)	1:500	Abcam	Alexa Fluor 546 (kozie) anty-mysie	1:500	Molecular Probes
Monoklonalne anty-Nestyna (mysz)	IgG1 1:200	Millipore	Alexa Fluor 546 (kozie) anty-mysie	1:500	Molecular Probes
Monoklonalne anty-NF200 (mysz)	IgG1 1:400	Sigma- Aldrich	Alexa Fluor 546 (kozie) anty-mysie	1:500	Molecular Probes

4.24. Wizualizacja mikroskopowa

Wyniki badań immunocyto- i immunohisto-chemicznych eksperymentów *in vitro* i *ex vivo* analizowano w mikroskopie konfokalnym LSM 780/ ELYRA PS.1 (Carl Zeiss, Warszawa, Polska) wyposażonym w lasery: do wzbudzania czerwonego barwnika Alexa Fluor 546, Ar wieloliniowy (458/488/514nm) do wzbudzania zielonego barwnika Alexa Fluor 488 oraz diodę (405 nm) wykorzystywaną do wzbudzania niebieskiego barwnika Hoechst 33258.

Wyniki uzyskane w badaniach immunohistochemicznych eksperymentów *in vivo* analizowano w systemie Cell Observer SD, wyposażonym w mikroskop Axio Observer Z.1 posiadający cztery lasery diodowe: 405 nm do wzbudzania niebieskiego barwnika Hoechst, 488nm do wzbudzania zielonego barwnika, 561nm i 635nm do wzbudzania czerwonych barwników Alexa Fluor 546 i Alexa Fluor 633). Po rejestracji zdjęcia były analizowane w programie ZEN 2012 (Carl Zeiss).

4.25. Analiza statystyczna

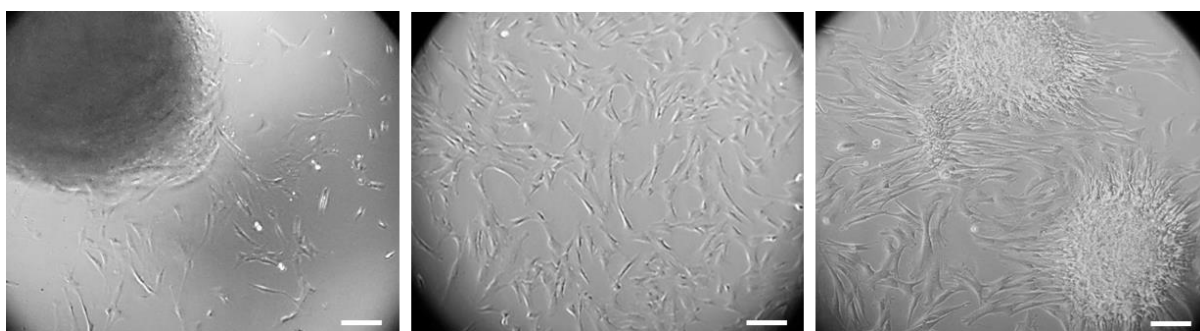
Otrzymane wyniki przedstawiono jako wartości średnie z szeregu doświadczeń \pm SEM. Liczbę powtórzeń zaznaczono w opisie rycin. Analizę statystyczną wykonano w programie GraphPad Prism 5 przy użyciu testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) oraz testu Bonferroni lub testu t-Studenta. Wyniki były uznawane za istotne statystycznie, gdy wartość $p < 0,05$. Poziom istotności statystycznej przedstawiono na wykresach w postaci gwiazdek: * - dla p mieszczącego się w przedziale $0,01 < p < 0,05$; ** - $0,001 < p < 0,01$; ***- $0,0001 < p < 0,001$, ****- $p < 0,0001$.

5.1. Doświadczenia *in vitro*

5.1.1. Weryfikacja mezenchymalnego charakteru WJ-MSC

5.1.1.1. Ocena morfologii WJ-MSC

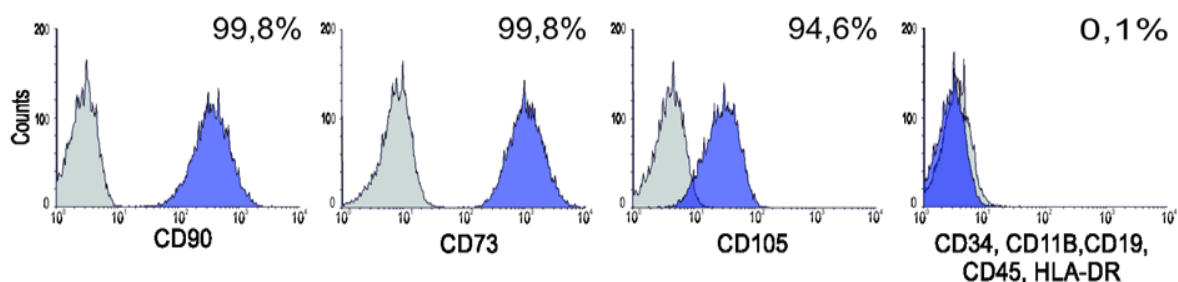
Pierwsze komórki migrujące z fragmentów galarety Whartona obserwowano po upływie 7-10 dni od założenia hodowli. Mezenchymalne komórki macierzyste wyizolowane z galarety Whartona stanowiły przylegającą do plastiku, heterogenną populację komórek o wydłużonym, wrzecionowatym kształcie. Komórki te były również zdolne do tworzenia centrów intensywnej proliferacji tzw. CFU (Ryc. 8.).



Ryc. 8. Morfologia WJ-MSC. Zdjęcia przedstawiające galaretę Whartona z wychodzącymi z niej WJ-MSC (lewa strona), hodowlę WJ-MSC na poziomie pierwszego pasażu (środek) oraz zdolność do tworzenia CFU przez wyizolowane komórki (prawa strona).

5.1.1.2. Analiza mezenchymalnych markerów powierzchniowych WJ-MSC

Ocenę obecności markerów mezenchymalnych wykonano przy pomocy cytometrii przepływowej. WJ-MSC po osiągnięciu ok. 80% konfluencji odczepiono od naczynek hodowlanych i rozpoczęto procedurę znakowania przeciwciałami. Do każdego pomiaru wykorzystano ok. 1×10^6 komórek. Wykazano że WJ-MSC posiadają typowy dla mezenchymalnych komórek macierzystych zestaw markerów powierzchniowych, ustalony przez ISCT. W przedstawianych wynikach reakcja dla przeciwciała skierowanego przeciwko CD90 była pozytywna dla 99,8%, CD73 dla 99,8% oraz CD105 dla 94,6% WJ-MSC. Reakcja dla markerów określanych mianem „negatywnych” była na niskim poziomie 0,1% dla WJ-MSC (Ryc. 9.).

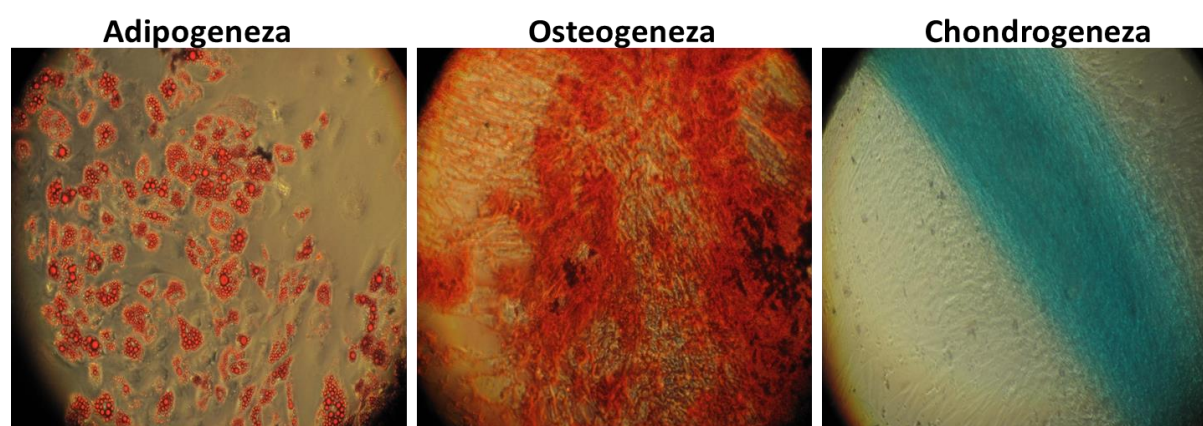


Ryc. 9. Charakterystyka cytometryczna markerów mezenchymalnych na powierzchni WJ-MSC. Wykresy reprezentatywne. WJ-MSC wykazywały pozytywną reakcję z przeciwciałami skierowanymi przeciwko CD90, CD73 i CD105 oraz negatywną reakcję z przeciwciałami skierowanymi przeciwko CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR. Pomiary powtarzano sześciokrotnie, pojedynczy wynik był uzyskiwany na podstawie 1×10^4 zliczeń.

5.1.1.3. Ocena zdolności WJ-MSC do różnicowania w komórki mezodermalne (adipocyty, osteocyty, chondrocyty)

Ocena potencjału mezenchymalnych komórek macierzystych do różnicowania w komórki pochodzące z mezodermy, w tym adipocyty, chondrocyty i osteocyty jest podstawowym etapem badań z udziałem tych komórek zalecanym przez ISCT. Wyizolowane z galarety Whartona MSC po ok. 30 DIV były inkubowane z komercyjnymi pożywkami kierującymi według protokołu producenta.

W wyniku 14-dniowego różnicowania w kierunku adipocytów, WJ-MSC zmieniły swój kształt z fibroblastycznego na bardziej owalny i można było zaobserwować wewnątrz komórek krople tłuszczu, które zostały uwidocznione przy pomocy reakcji z czerwiecią olejową. Po 21 dniach różnicowania w kierunku osteocytów WJ-MSC zaczęły intensywnie produkować sole wapnia, których obecność wykryto za pomocą barwienia z użyciem czerwieni alizarynowej. Natomiast w wyniku 14 dni różnicowania w kierunku chondrocytów, WJ-MSC tworzyły skupiska gwiazdziste rozchodzących się centrów komórkowych produkujących glikozaminoglikany wybarwione błękitem alcjanowym (Ryc. 10.).



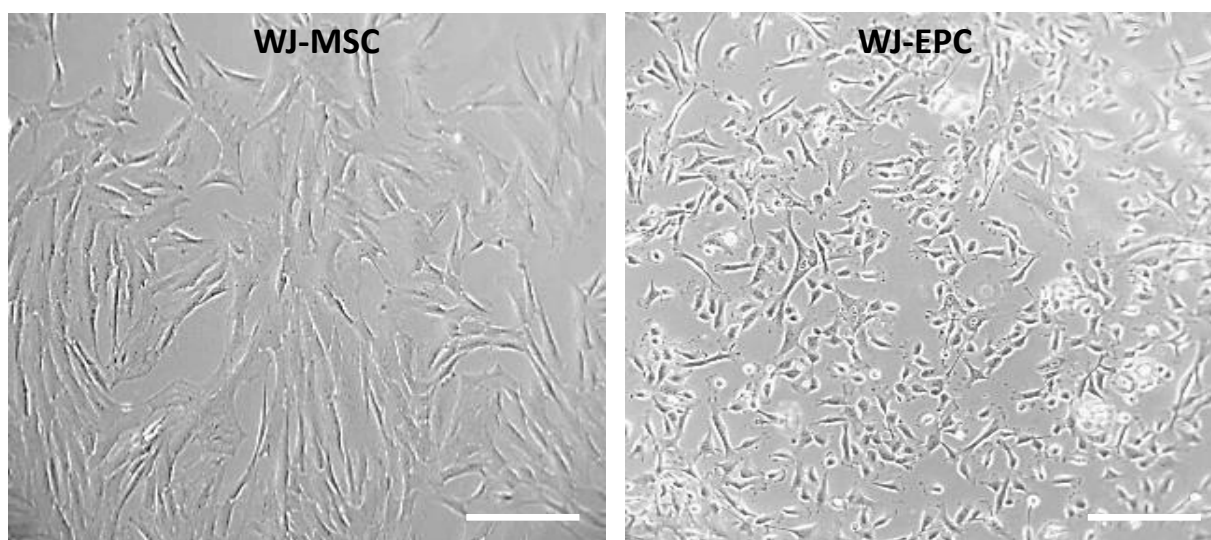
Ryc. 10. Reprezentatywne zdjęcia wielokierunkowego różnicowania WJ-MSC. Komórki różnicowane w kierunku: **adipocytów** z kroplami tłuszczu zabarwionymi czerwiecią olejową (lewa strona); **osteocytów** ze zwizualizowanymi przy pomocy czerwieni alizarynowej solami wapnia oraz **chondrocytów** z glikozaminoglikanami zabarwionymi błękitem alcjanowym. Eksperyment powtórzono trzykrotnie.

5.1.2. Różnicowanie śródbłonkowe WJ-MSC

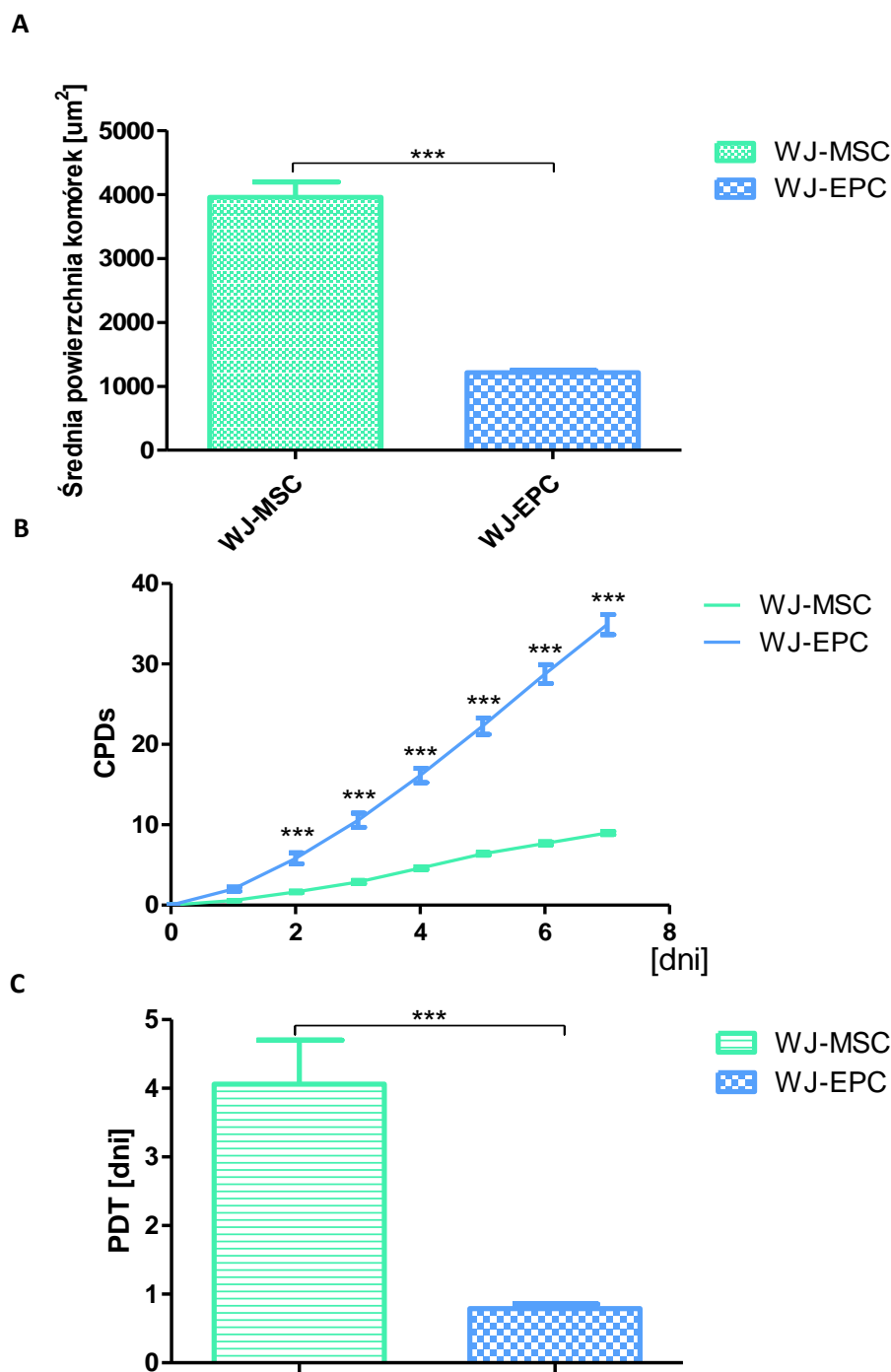
5.1.2.1. Wpływ różnicowania w kierunku śródbłonka na morfologię i tempo wzrostu WJ-MSC

W wyniku opisanego wcześniej różnicowania śródbłonkowego mezenchymalne komórki macierzyste zmieniły swoją morfologię i tempo wzrostu. Już po 4 dniach różnicowania można było zaobserwować pierwsze zmiany w ich wielkości i wyglądzie. Po 7 dniach w pożywce EGM-2 WJ-EPC nabrały cech morfologicznych typowych dla komórek śródbłonka m.in. zmieniając kształt na bardziej owalny i sześcienny oraz zmniejszając 3,3-krotnie swoją wielkość (średnia powierzchnia $1213 \mu\text{m}^2$ ($\pm 33,34 \mu\text{m}^2$)) w porównaniu do WJ-MSC (średnia powierzchnia $3957 \mu\text{m}^2$ ($\pm 237 \mu\text{m}^2$)) (Ryc. 11 i 12 A).

Różnicowanie w kierunku śródbłonka znacząco zwiększyło potencjał proliferacyjny komórek mezenchymalnych. Skumulowana liczba podwojeń populacji (CPDs) WJ-EPC była znacząco wyższa, wynosząc w dniach od 1-7 odpowiednio: 2 ($\pm 0,25$); 5,8 ($\pm 0,7$); 10,5 ($\pm 0,9$); 16,2 ($\pm 0,9$); 22,3 (± 1); 28,7 ($\pm 1,2$) i 34,9 ($\pm 1,25$) w porównaniu do WJ-MSC w przypadku których wynosiła: 0,6 ($\pm 0,01$); 1,6 ($\pm 0,01$); 2,9 ($\pm 0,2$); 4,6 (0,18); 6,4 ($\pm 0,17$); 7,7 ($\pm 0,2$) i 8,9 ($\pm 0,2$). Ponadto między dniami 2-7 różnice były istotne statystycznie. Średni czas podwajania populacji (PDT) mierzony w trakcie trwania drugiego pasażu w przypadku komórek WJ-EPC wynosił 0,78 dnia ($\pm 0,07$ dnia) i był 5,15- raza krótszy w porównaniu do WJ-MSC, w których wynosił 4 dni ($\pm 0,64$ dnia) (Ryc. 12 B i C).



Ryc. 11. Wpływ różnicowania w kierunku śródbłonka na morfologię mezenchymalnych komórek macierzystych. Zdjęcie z mikroskopu świetlnego przedstawiające zmianę kształtu i wielkości WJ-EPC. Skala 100 μm .

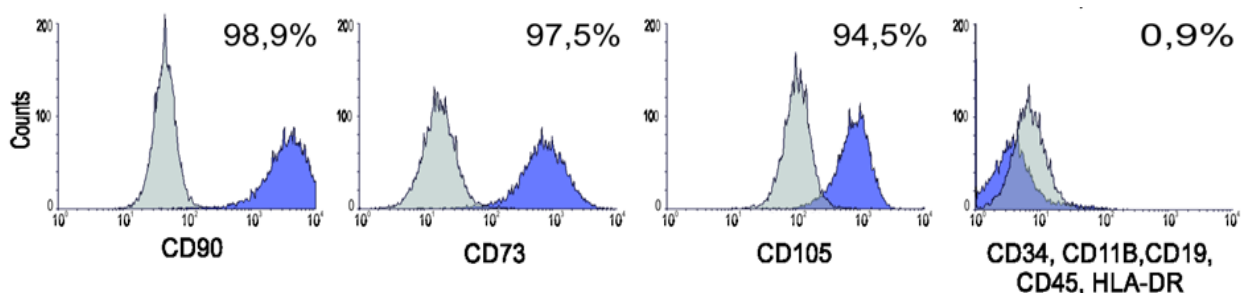


Pasaż II

Ryc. 12. Wpływ różnicowania w kierunku śródbłonka na morfologię i tempo proliferacji mezenchymalnych komórek macierzystych. A/ Wykres przedstawiający średnią powierzchnię komórek WJ-MSC oraz WJ-EPC ($n=100$). **B/ i C/ Porównanie tempa proliferacji WJ-MSC i WJ-EPC.** B/ Komórki różnicowane śródbłonkowo wykazują wyższe tempo proliferacji, co można zaobserwować na wykresie skumulowanej liczby podwojeń populacji (CPDs) w zależności od czasu hodowli ($n=6$). C/ Zwiększone tempo proliferacji jest charakterystyczne dla dojrzałych komórek śródbłonka. Średni czas podwajania populacji (PDT) dla WJ-EPC jest na stałym, 5-krotnie niższym poziomie w stosunku do WJ-MSC ($n=7$). Analizy statystyczne wykonano przy pomocy testu t-Studenta (\pm SEM, * - dla p mieszczącego się w przedziale $0,01 < p < 0,05$; ** - $0,001 < p < 0,01$; ***- $0,0001 < p < 0,001$).

5.1.2.2. Cytometryczna analiza obecności markerów mezenchymalnych na powierzchni WJ-EPC

Wykazano że WJ-EPC pomimo ukierunkowania śródbłonkowego posiadają typowy dla mezenchymalnych komórek macierzystych zestaw markerów powierzchniowych. W przedstawianych wynikach reakcja dla przeciwciała skierowanego przeciwko CD90 była pozytywna dla 98,9% WJ-EPC, 97,5% komórek wykazywało obecność markera CD73 oraz 94,4% reagowało pozytywnie z przeciwciałem anti-CD105. Reakcja dla przeciwciał skierowanych przeciwko CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR była na niskim poziomie i wynosiła 0,9% populacji WJ-EPC (Ryc. 13.).



Ryc. 13. Analiza cytometryczna markerów mezenchymalnych na powierzchni WJ-EPC. Wykresy reprezentatywne. Niezależnie od stopnia zróżnicowania WJ-EPC wykazywały pozytywną reakcję z przeciwciałami skierowanymi przeciwko CD90, CD73 i CD105 oraz negatywną reakcję z przeciwciałami skierowanymi przeciwko CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR. Pomiary powtarzano sześciokrotnie, pojedynczy wynik był uzyskiwany na podstawie 1×10^4 zliczeń.

5.1.2.3. Porównanie ekspresji markerów śródbłonkowych w WJ-MSC i WJ-EPC

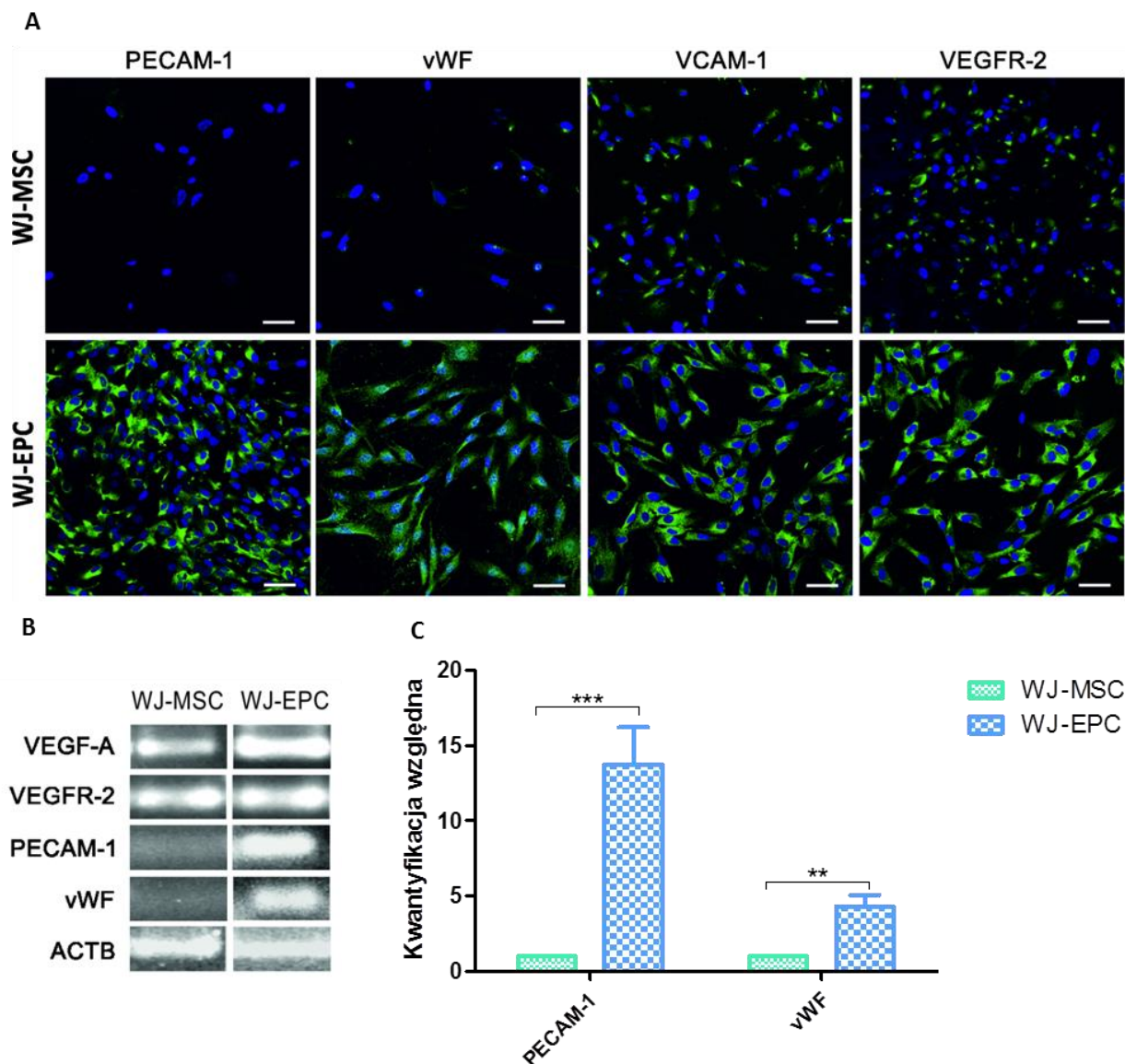
Analizę ekspresji markerów śródbłonkowych przeprowadzono na podstawie badań immunohistochemicznych, RT-PCR i qRT-PCR.

W analizie immunohistochemicznej wykazano pozytywną reakcję dla obu typów komórek z przeciwciałami skierowanymi przeciwko VEGFR-2 oraz VCAM-1. W przypadku mezenchymalnych komórek macierzystych różnicowanych w kierunku śródbłonka reakcja ta była silniejsza. Obecność specyficznych markerów śródbłonkowych PECAM-1 i vWF wykazano tylko w populacji komórek WJ-EPC, nieróżnicowane WJ-MSC nie wykazywały pozytywnej reakcji z przeciwciałami skierowanymi przeciwko tym białkom (Ryc. 14 A).

Wspólna ekspresja czynnika VEGF-A oraz receptora dla tego czynnika VEGFR-2 w WJ-MSC oraz WJ-EPC została wykazana w półilościowej analizie RT-PCR. Ponadto potwierdzono wyniki analizy immunohistochemicznej, wykazując ekspresję specyficznych śródbłonkowo markerów vWF i PECAM-1 w komórkach WJ-EPC, przy braku ekspresji w komórkach nieróżnicowanych (Ryc. 14 B).

W celu wyodrębnienia różnic ilościowych pomiędzy WJ-MSC i WJ-EPC w ekspresji specyficznych markerów śródbłonkowych przeprowadzono analizę metodą ilościowej oceny ekspresji genów w czasie rzeczywistym (qRT-PCR). Otrzymane wyniki wykazały zróżnicowany poziom ekspresji mRNA dla vWF i PECAM-1 w WJ-MSC i WJ-EPC. Zaobserwowano statystycznie istotnie wyższy poziom ekspresji genów dla vWF i PECAM-1 w komórkach różnicowanych w kierunku śródbłonka. Ilościowa ekspresja transkryptu genu dla vWF wykazywała czterokrotnie wyższą wartość uzyskaną w WJ-EPC.

Wyższą ekspresję zaobserwowano również dla śródbłonkowego markera powierzchniowego PECAM-1, która była czternastokrotnie większa w WJ-EPC w porównaniu do WJ-MSc (Ryc. 14 C).



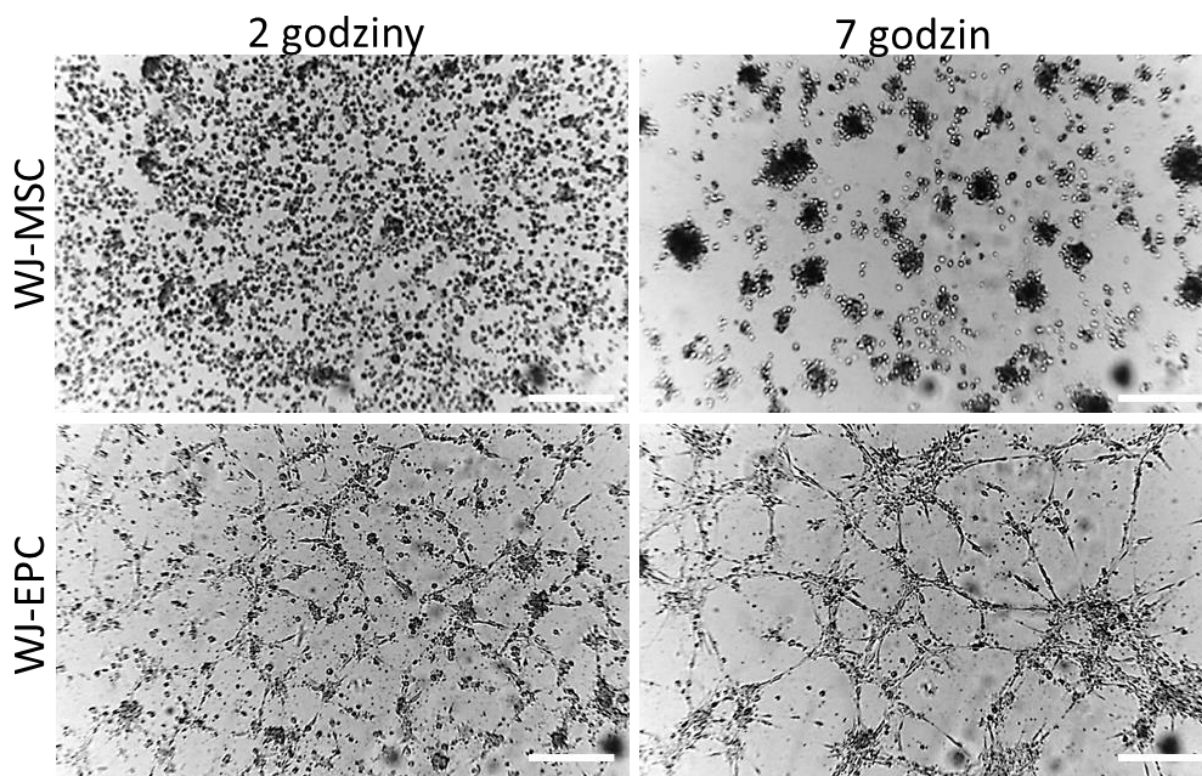
Ryc. 14. Charakterystyka ekspresji markerów śródbłonkowych w WJ-MSc i WJ-EPC. *A/* Obrazy z mikroskopu konfokalnego przedstawiające reakcje na przeciwciała skierowane przeciwko PECAM-1, vWF, VCAM-1 i VEGFR-2 (kolor zielony). Jądra komórkowe wyznakowano przy użyciu Hoechst 33258 na niebiesko. Skala 100µm. *A/ B/ C/* W wyniku analiz immunocytochemicznych, RT-PCR oraz qRT-PCR stwierdzono, że zarówno WJ-MSc, jak i WJ-EPC wykazywały ekspresję markerów śródbłonkowych dla VEGF-A, VEGFR-2 oraz VCAM-1, ale tylko różnicowane przez 7 dni komórki wykazywały ekspresję specyficznych markerów endotelialnych PECAM-1 oraz vWF. Analizę statystyczną wykonano przy pomocy testu t-Studenta (\pm SEM, n=6, * - dla p mieszczącego się w przedziale $0,01 < p < 0,05$; ** - $0,001 < p < 0,01$; *** - $0,0001 < p < 0,001$).

5.1.2.4. Ocena funkcjonalnego zróżnicowania WJ-EPC

W kolejnych doświadczeniach, aby uwidocznić funkcjonalne zróżnicowanie komórek w kierunku progenitorów śródbłonna, wykonano test tworzenia struktur kapilaropodobnych (pseudonaczyniowych) na macierzy zewnątrzkomórkowej utworzonej z Matrigel oraz oceniono zdolność WJ-EPC do wychwytu lipoprotein niskiej gęstości (DiI-AC-LDL).

Komórki mezenchymalne pochodzące z galarety Whartona hodowane zaledwie przez 4 dni w pożywce EGM-2, a następnie wysiane na Matrigel były już zdolne do tworzenia struktur kapilaropodobnych. Jednak sieci stworzone przez WJ-EPC, które były różnicowane przez 7 dni były trwalsze, bardziej złożone, a średnice pętli były większe.

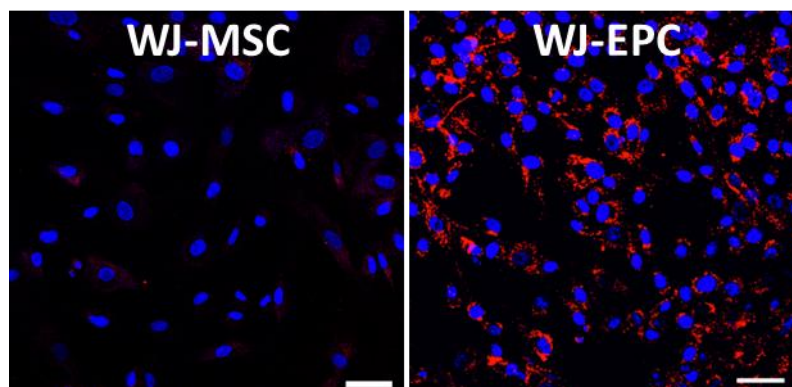
Początek tworzenia struktur kapilaropodobnych przez WJ-EPC różnicowanych przez 7 dni był widoczny już po 2 godzinach inkubacji na Matrigel, natomiast największą liczbę pętli i połączeń można było zaobserwować po 7 godzinach hodowli. W ósmej godzinie inkubacji komórki zaczynały grupować się w agregaty, a średnice pętli oraz długość struktur kapilaropodobnych zwiększały się. Nie wykazano zdolności do tworzenia struktur kapilaropodobnych w komórkach nieróżnicowanych (Ryc. 15.).



Ryc. 15. Porównanie zdolności do tworzenia struktur kapilaropodobnych. Zdjęcia z mikroskopu świetlnego przedstawiające tworzenie struktur kapilaropodobnych przez WJ-MSC i WJ-EPC różnicowanych przez 7 dni w medium EGM-2 po 2 godzinach oraz po 7 godzinach inkubacji na podłożu Matrigel. Skala 200 μ m.

Wychwyt DiI-AC-LDL jest specyficzną cechą komórek endotelialnych i makrofagów, u których proces ten zachodzi przy pomocy receptorów zmiataczy. Komórki mezenchymalne różnicowane przez 7 dni w kierunku endotelialnym w medium EGM-2, inkubowano z 10 μ g/ml DiI-Ac-LDL. WJ-EPC

wychwytywały DiL-AC-LDL już po 4 godzinach hodowli z odczynnikiem. Komórki kontrolne, nieróżnicowane WJ-MSC nie wykazywały zdolności do wychwytu DiL-AC-LDL po tym czasie (Ryc. 16.).



Ryc. 16. Ocena zdolności do wychwytu LDL. Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiający wychwytywanie DiL-Ac-LDL (czerwony kolor) przez WJ-EPC oraz WJ-MSC po 4 godzinach inkubacji z odczynnikiem. Jądra komórkowe wyznakowano przy pomocy Hoechst 33258 na niebiesko. Skala 50 μm .

5.1.3. Ocena właściwości parakrynych WJ-MSC i WJ-EPC po stymulacji receptorów Toll-podobnych

W dalszych badaniach w celu poznania mechanizmu protekcyjnego działania WJ-MSC i WJ-EPC skupiono się na ocenie ich właściwości parakrynych. Wybrano kilka kluczowych czynników odgrywających prawdopodobnie istotną rolę w procesie regeneracji NVU, w tym TGF- β 1, IL-6 i VEGF. Zgodnie z opisaną metodą w celu zwiększenia wydzielania powyższych czynników stymulowano receptory Toll-podobne WJ-MSC i WJ-EPC z zastosowaniem agonistów TLR4 - ultraczystego lipolisacharydu (LPS) oraz TLR3 – Poli(I:C) (Ryc. 17.).

W badaniach stwierdzono nieznacznie wyższy poziom sekrecji czynnika TGF- β 1 w niestymulowanych WJ-EPC (17554 pg/ml (\pm 4859 pg/ml)) w stosunku do niestymulowanych WJ-MSC (8066 pg/ml (\pm 2100 pg/ml)), jednak różnica ta nie była istotna statystycznie. Nie zaobserwowano istotnego wpływu stymulacji na wzrost wydzielania tego czynnika w hodowli WJ-MSC. Zarówno niższe stężenia agonistów LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ i Poly(I:C) 1 $\mu\text{l/ml}$ jak i wyższe LPS 50 $\mu\text{g/ml}$ i Poly(I:C) 10 $\mu\text{l/ml}$ nie wpłynęły na wydzielanie TGF- β 1 który był na poziomie kolejno: 3162 pg/ml (\pm 603 pg/ml) i 2478 pg/ml (\pm 513,6 pg/ml) oraz 19366 pg/ml (\pm 5846 pg/ml) i 3238 pg/ml (\pm 793 pg/ml). Natomiast w przypadku komórek WJ-EPC zaobserwowano statystycznie istotne zwiększenie poziomu TGF- β 1 przy wyższych stężeniach LPS (50 ng/ml) oraz Poly(I:C) (10 $\mu\text{l/ml}$), odpowiednio 65846 pg/ml (\pm 13748 pg/ml) i 50656 pg/ml (\pm 16471 pg/ml). W przypadku niższych stężeń nie zaobserwowano zmian w sekrecji tego czynnika, a jego poziom był następujący: dla LPS 10 ng/ml- 16208 pg/ml (\pm 3141 pg/ml) oraz dla Poly(I:C) 1 $\mu\text{l/ml}$ - 17555 pg/ml (\pm 3286 pg/ml). Istotnie statystycznie zmiany w sekrecji TGF- β 1 zaobserwowano również między grupami. WJ-EPC odpowiadało silniej na stymulację LPS (50 ng/ml) oraz Poly(I:C) (10 $\mu\text{l/ml}$) niż WJ-MSC w tych samych stężeniach agonistów receptorów Toll-podobnych. W niższych stężeniach stymulantów zmiany były nieistotne statystycznie.

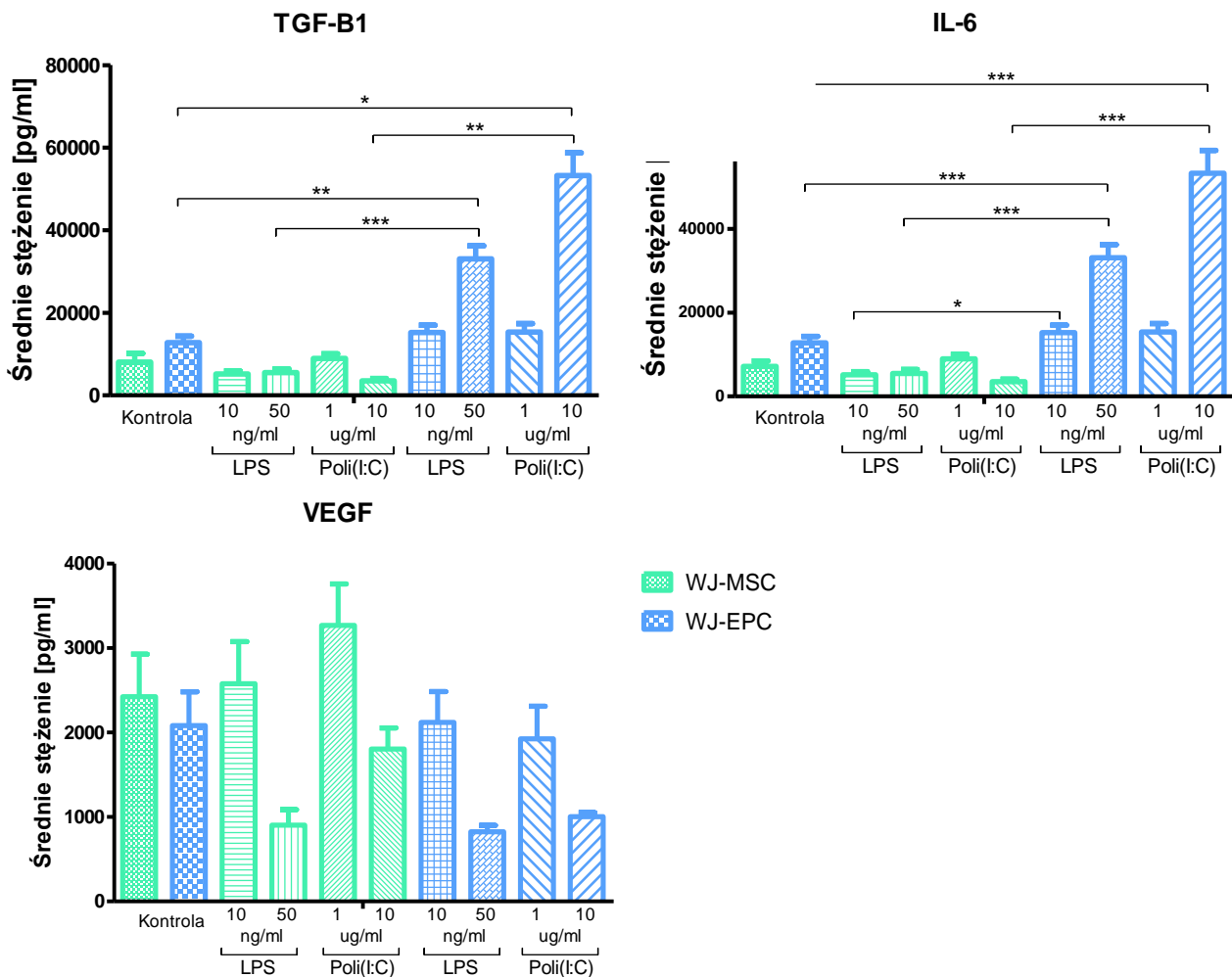
Podobnie jak w poprzednim przypadku niestymulowane WJ-EPC wykazywały nieco wyższą (12788 pg/ml (\pm 1516 pg/ml)), acz nieistotną statystycznie sekrecję IL-6, w porównaniu do WJ-MSC (7158 pg/ml (\pm 1274 pg/ml)). Nie zaobserwowano wpływu agonistów receptorów Toll-podobnych na sekrecję IL-6 przez WJ-MSC, której stężenie wynosiło odpowiednio: dla LPS 10 μ g/ml- 5180 pg/ml (\pm 724 pg/ml) i Poly(I:C) 1 μ l/ml- 8970 pg/ml (\pm 1075 pg/ml) oraz dla LPS 50 μ g/ml- 5492 pg/ml (\pm 924,5 pg/ml) i Poly(I:C) 10 μ l/ml- 3536 pg/ml (\pm 561,5 pg/ml). WJ-EPC wydzielają IL-6 na istotnie statystycznie wyższym poziomie przy stymulacji z zastosowaniem LPS 50 μ g/ml i Poly(I:C) 10 μ l/ml (33090 pg/ml (\pm 3141 pg/ml) i 53247 pg/ml (\pm 5472 pg/ml)) w porównaniu do komórek niestymulowanych. Niższe stężenia agonistów LPS 10 μ g/ml i Poly(I:C) 1 μ l/ml nie wywarły efektu stymulacyjnego na wydzielanie IL-6, której poziom wynosił odpowiednio 15232 pg/ml (\pm 1762 pg/ml) i 15348 pg/ml (\pm 2020 pg/ml). Ponadto WJ-EPC odpowiadały istotnie statystycznie silniej na stymulację agonistami receptorów Toll-podobnych w stężeniach LPS 10 μ g/ml i 50 μ g/ml oraz Poly(I:C) 10 μ l/ml w stosunku do WJ-MSC.

Sekrecja VEGF w kontrolnych hodowlach WJ-MSC i WJ-EPC była na podobnym poziomie, wynosząc kolejno 2425 pg/ml (\pm 502,9 pg/ml) i 2082 pg/ml (\pm 400,7 pg/ml). Nie zaobserwowano istotnego statystycznie wpływu stymulacji zarówno w niższych stężeniach agonistów LPS 10 μ g/ml i Poly(I:C) 1 μ l/ml jak i wyższych LPS 50 μ g/ml i Poly(I:C) 10 μ l/ml w obu typach komórek. Dla WJ-MSC sekrecja VEGF była następująca: dla LPS 10 μ g/ml- 2577 pg/ml (\pm 500,2 pg/ml) i Poly(I:C) 1 μ l/ml- 3269 pg/ml (\pm 489,8 pg/ml) oraz dla LPS 50 μ g/ml- 902 pg/ml (\pm 186,3 pg/ml) i Poly(I:C) 10 μ l/ml- 1805 pg/ml (\pm 247,9 pg/ml). W przypadku WJ-EPC stężenie VEGF w zależności od ilości dodanych do hodowli agonistów wyglądało następująco: dla LPS 10 μ g/ml- 2120 pg/ml (\pm 363,7 pg/ml) i Poly(I:C) 1 μ l/ml- 1925 pg/ml (\pm 387,5 pg/ml) oraz dla LPS 50 μ g/ml- 825 pg/ml (\pm 75,9 pg/ml) i Poly(I:C) 10 μ l/ml- 1004 pg/ml (\pm 47,19 pg/ml).

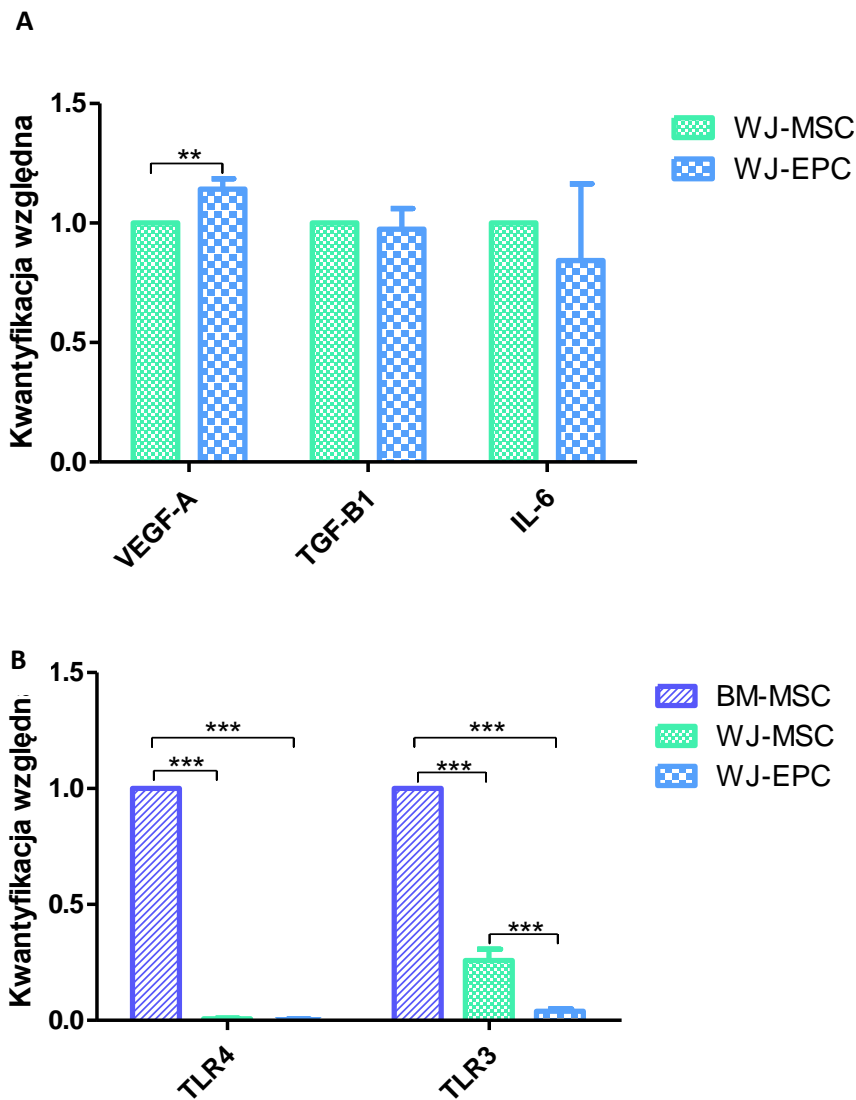
W kolejnych doświadczeniach przy pomocy metody qRT-PCR wykonano ilościową ocenę ekspresji genów VEGF-A, TGF- β 1 i IL-6 dla niestymulowanych LPS i Poly(I:C) populacji WJ-MSC i WJ-EPC. Otrzymane wyniki wykazały podobny poziom ekspresji mRNA dla wybranych czynników. Jedynie w przypadku VEGF-A zaobserwowano statystycznie istotnie wyższą ekspresję w komórkach WJ-EPC, w stosunku do WJ-MSC (Ryc. 17 A).

Zważywszy na nieznaczną reakcję WJ-MSC i WJ-EPC na stymulację agonistami receptorów Toll-podobnych, wykonano za pomocą qRT-PCR ilościowe porównanie ekspresji TLR4 i TLR3 w populacjach niestymulowanych LPS i Poly(I:C) WJ-MSC i WJ-EPC w stosunku do mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego od dorosłego dawcy (BM-MSC). BM-MSC wybrano jako kontrolę ze względu na ich pełną dojrzałość immunologiczną.

Otrzymane wyniki ujawniły istotnie statystycznie niższy poziom ekspresji receptorów TLR3/4 w obu populacjach komórek w porównaniu do BM-MSC. Ilościowa ekspresja transkryptu genu dla TLR4 wykazywała znikomy, niemal zerowy poziom zarówno w WJ-MSC jak i WJ-EPC. Ekspresja transkryptu genu dla TLR3 znajdowała się również na niskim poziomie w obu populacjach w stosunku do BM-MSC. Ponadto zaobserwowano istotnie statystycznie wyższy poziom ekspresji TLR3 w WJ-MSC w porównaniu do WJ-EPC (Ryc. 17 B).



Ryc. 17. Charakterystyka sekrecji TGF-β1, IL-6 i VEGF przez WJ-MSC i WJ-EPC stymulowane agonistami receptorów TLR3/4. Kontrolne populacje WJ-EPC i WJ-MSC wykazywały sekrecję TGF-β1, IL-6 i VEGF na podobnym poziomie. WJ-MSC były niewrażliwe na stymulację receptorów TLR3 i TLR4 niezależnie od stężenia agonistów. WJ-EPC w wyższych stężeniach agonistów receptorów TLR3/4 wydzielają IL-6 i TGF-β1 na wyższym poziomie w stosunku do kontroli. Różnicowane w kierunku śródbłonna komórki wykazywały zwiększoną wrażliwość na stymulację LPS i Poly(I:C) w porównaniu do WJ-MSC. Granica wykrywalności 10 pg/ml. Analizę statystyczną wykonano przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu Bonferroni. Pojedynczy wynik jest średnią z trzech niezależnych eksperymentów, w których każdorazowo zliczano 200 zdarzeń na cytometrze (\pm SEM, $n=3$, * - dla p mieszczącego się w przedziale $0,01 < p < 0,05$; ** - $0,001 < p < 0,01$; *** - $0,0001 < p < 0,001$).



Ryc. 18. Relatywna ekspresja mRNA dla A/ VEGF-A, TGF-β1 i IL-6 oraz B/ TLR4 i TLR3. Wykresy przedstawiają wyniki porównania ekspresji genów uzyskane metodą $\Delta\Delta Ct$ (Real-Time RT-PCR) wyrażone w jednostkach względnych. Każda z prób była normalizowana w stosunku do genu referencyjnego ACTB. Wyniki badań przedstawiono jako wartości średnie. Analizę statystyczną wykonano przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu Bonferroni. ($\pm SEM$, $n=3$, * - dla p mieszczącego się w przedziale $0,01 < p < 0,05$; ** - $0,001 < p < 0,01$; *** - $0,0001 < p < 0,001$).

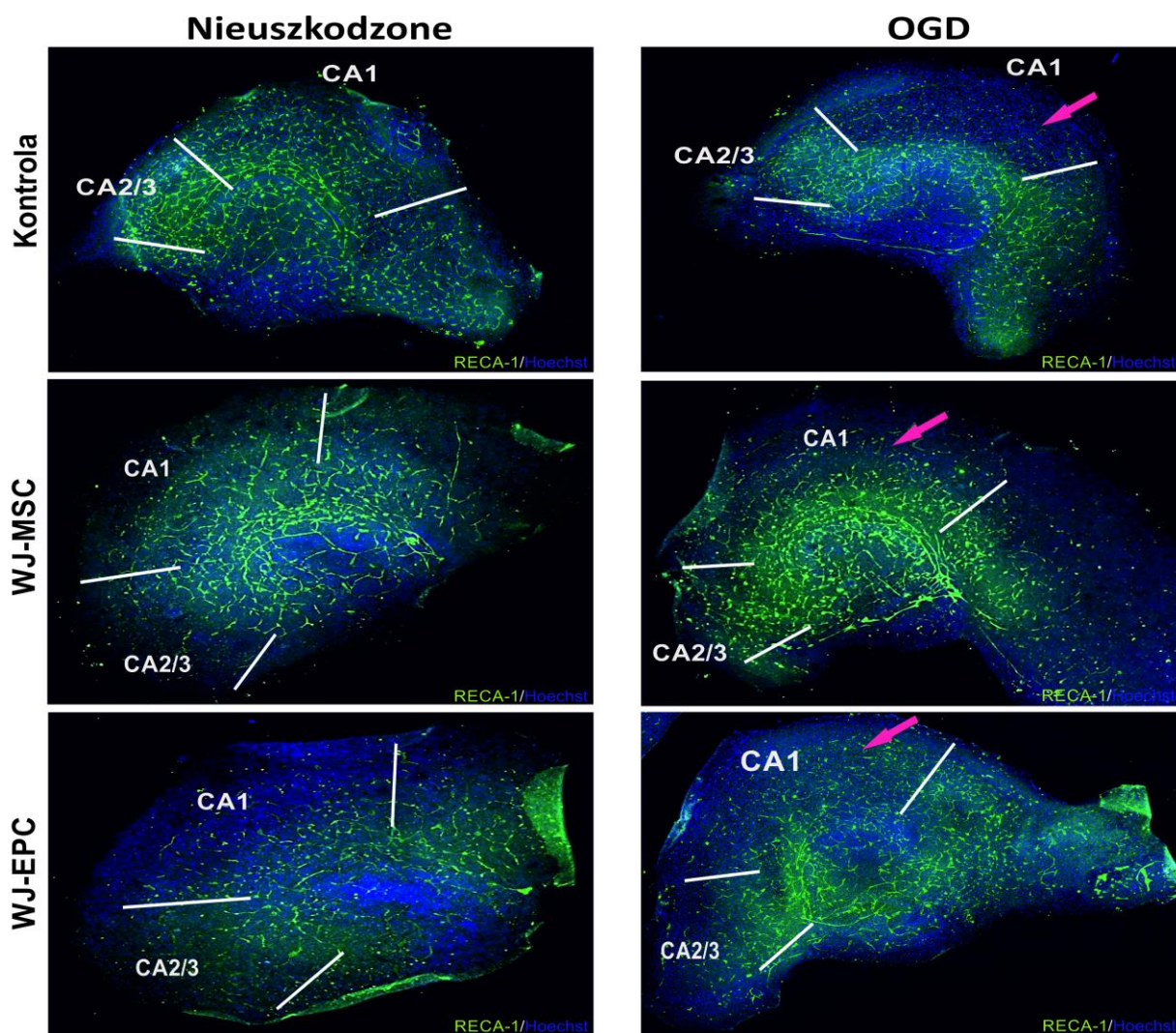
5.2. Doświadczenia ex vivo

5.2.1. Właściwości naczynioprotekcyjne WJ-MSC i WJ-EPC w organotypowej hodowli skrawków hipokampa

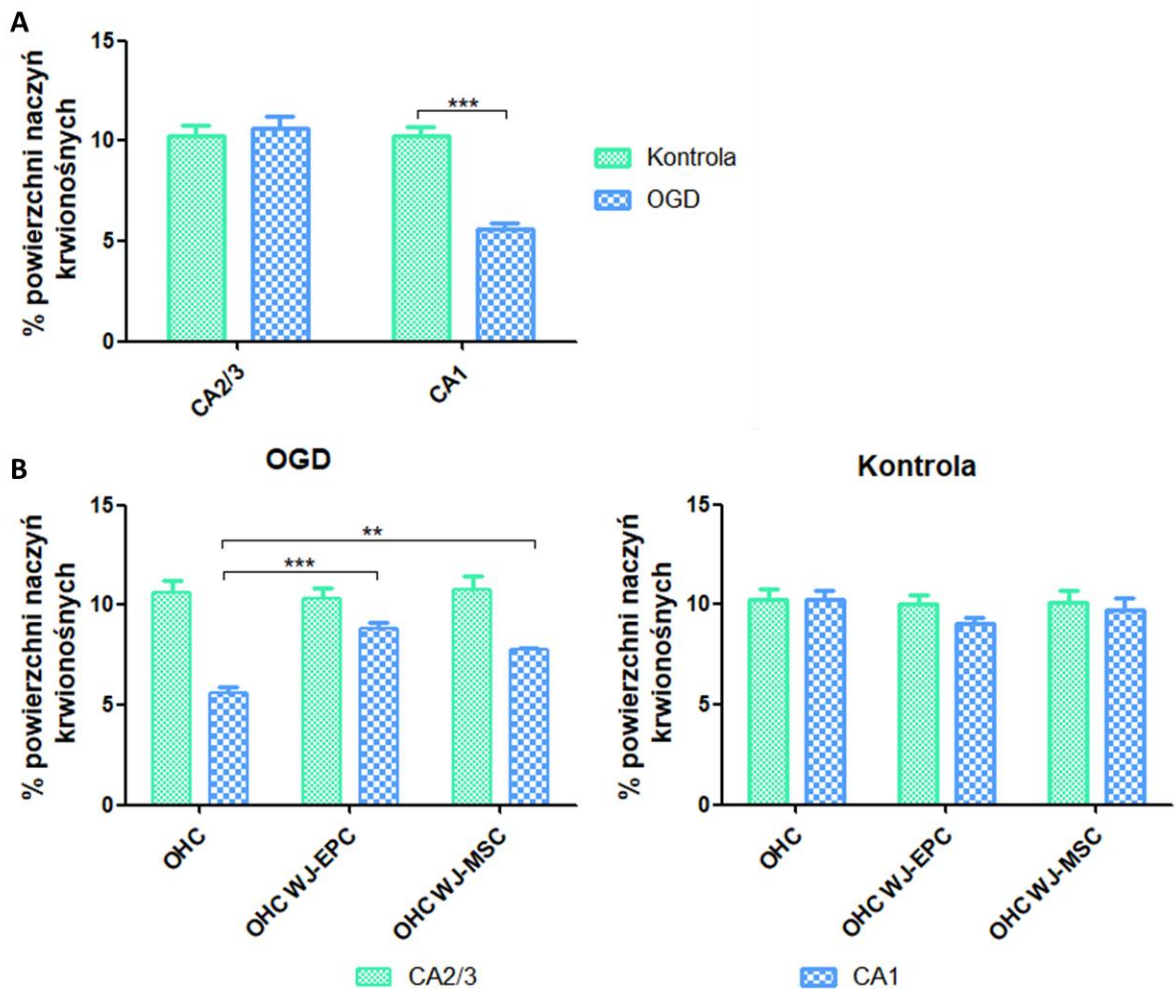
W badaniach *ex vivo* porównywano zmiany w gęstości naczyń krwionośnych w szczególnie wrażliwym na niedobory glukozy i tlenu regionie CA1 oraz w regionie referencyjnym CA2/3 hipokampa szczura po czasowym pozbawieniu glukozy i tlenu oraz współhodowli pośredniej z WJ-MSC lub WJ-EPC (Ryc. 18.).

Skrawki hipokampa czasowo pozbawione glukozy i tlenu, wykazywały istotny statystycznie dwukrotnie wyższy zanik naczyń krwionośnych w regionie CA1 (5,6% ($\pm 0,3\%$)) w porównaniu do nieuszkodzonych kontroli (10,2% ($\pm 0,44\%$)). W rejonie CA2/3 gęstość naczyń krwionośnych

utrzymywała się na stabilnym poziomie, zarówno w zdrowej (10,3% (\pm 0,5%)) jak i uszkodzonej tkance (10,6% (\pm 0,6%)). We współhodowli zdrowych skrawków organotypowych z WJ-MSC lub WJ-EPC nie zaobserwowano istotnej różnicy w gęstości naczyń krwionośnych, oscylującej w okolicy 10% (\pm 1%). Natomiast we współhodowli WJ-MSC lub WJ-EPC z uszkodzonymi przez OGD organotypowymi skrawkami hipokampa zaobserwowano istotną statystycznie większą gęstość naczyń krwionośnych (odpowiednio 7,7% (\pm 0,1%) i 8,8% (\pm 0,3%)) w porównaniu do kontroli OHC-OGD (5,6% (\pm 0,3%)) (Ryc. 19.).



Ryc. 19. Porównanie wpływu WJ-EPC i WJ-MSC na gęstość naczyń krwionośnych w organotypowej hodowli skrawków hipokampa (OHC). Zdjęcia wykonano przy pomocy mikroskopu konfokalnego metodą „tile scan”. Naczynia krwionośne wyznakowano markerem specyficznym dla szczurzych komórek endotelialnych RECA-1 (zielony), a jądra komórkowe zabarwiono przy pomocy Hoechst 33258 (niebieski). Różową strzałką zaznaczono region CA1, w którym zmieniła się gęstość naczyń krwionośnych pod wpływem współhodowli pośredniej z komórkami WJ-MSC lub WJ-EPC.

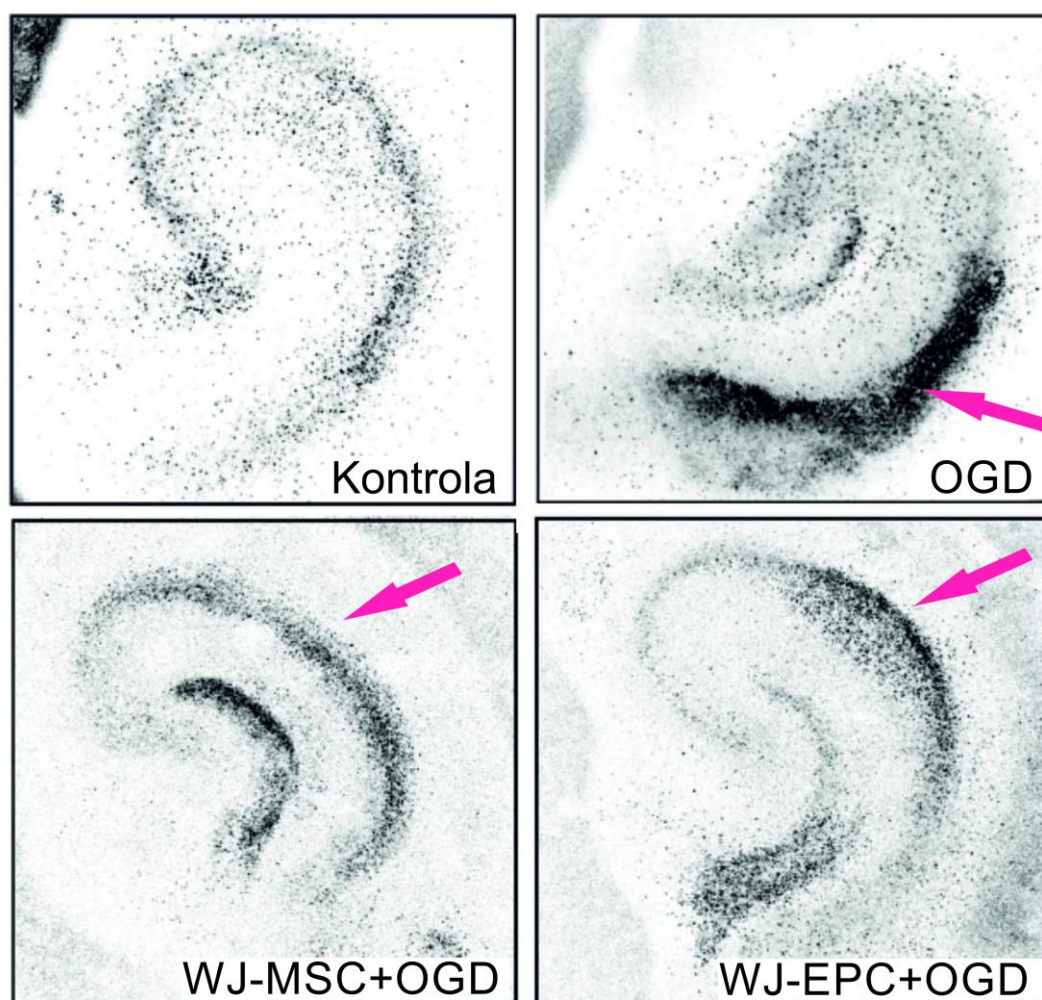


Ryc. 20. Wpływ pośredniej współpodowli OHC z WJ-MSC lub WJ-EPC na gęstość naczyń krwionośnych w regionach CA1 i CA2/3. A/ Wykres przedstawiający wpływ uszkodzenia OGD na gęstość naczyń krwionośnych w OHC w regionach CA1 i CA2/3. Na skutek czasowego pozbawienia glukozy i tlenu obserwuje się istotną atrofię naczyń krwionośnych w regionie CA1 hipokampa w porównaniu do regionu CA1 w nieuszkodzonym skrawku. B/ Wykresy przedstawiające wpływ WJ-MSC lub WJ-EPC na gęstość naczyń krwionośnych we współpodowli z kontrolnymi (nieuszkodzonymi) lub uszkodzonymi przez OGD skrawkami organotypowymi hipokampa. Współpodowla z obydwoima typami komórek nie wpływa na gęstość naczyń krwionośnych kontrolnych OHC. Zarówno we współpodowli z WJ-EPC jak i WJ-MSC wykazano zwiększoną gęstość naczyń krwionośnych w regionie CA1 OHC-OGD w porównaniu do OHC-OGD bez komórek. Wyniki wyrażono jako procent powierzchni naczyń krwionośnych w stosunku do zaznaczonego regionu CA1 lub CA2/3. Każda wartość jest średnią uzyskaną z analizy hipokampów pięciu zwierząt, przy trzech powtórzeniach każdego oznaczenia. Analizę statystyczną wykonano przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu Bonferroni (\pm SEM, $n=5$, * - dla p mieszczącego się w przedziale $0,01 < p < 0,05$; ** - $0,001 < p < 0,01$; * - $0,0001 < p < 0,001$).**

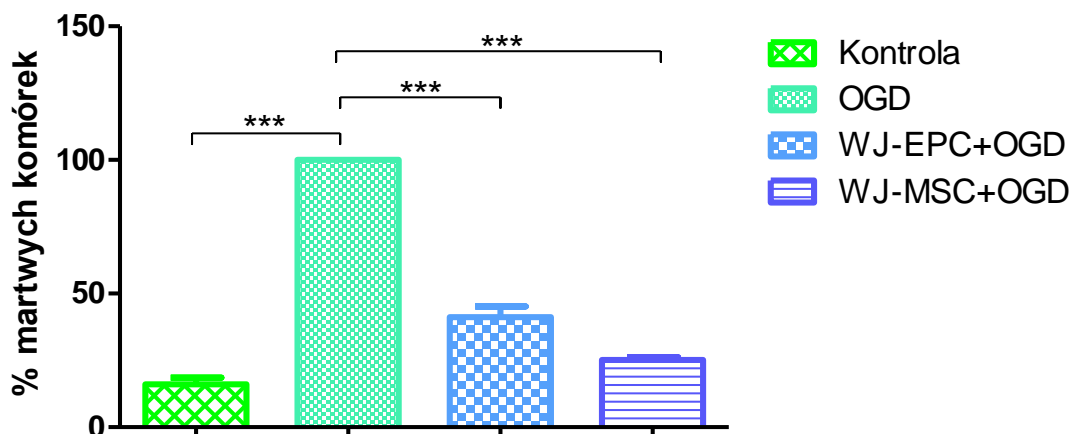
5.2.2. Właściwości neuroprotektcyjne WJ-MSC i WJ-EPC w organotypowej hodowli skrawków hipokampa

W dalszych doświadczeniach *ex vivo* analizowano przeżywalność komórek w regionie CA1 hipokampa w celu oceny właściwości neuroprotektcyjnych WJ-MSC i WJ-EPC (Ryc. 20 A).

W wyniku uszkodzenia OGD skrawków hipokampa po 24 godzinach w regionie CA1 zaobserwowano istotną statystycznie, ponad sześciokrotnie większą śmiertelność komórek w porównaniu do nieuszkodzonej tkanki hipokampa (16% (\pm 2,5%)). Na skutek współhodowli OHC z obudwoma typami komórek dochodziło do istotnego statystycznie zahamowania zamierania komórek w regionie CA1. Największy efekt protekcyjny zaobserwowano we współhodowli z WJ-MSC, gdzie śmiertelność komórek spadła o 75% (25% martwych komórek (\pm 1,2%)). Natomiast we współhodowli z WJ-EPC było o 59% mniej martwych komórek (41,2% (\pm 4%)) w porównaniu do uszkodzonych skrawków bez komórek w regionie CA1 (Ryc. 20 B).



Ryc. 21. Wizualizacja mikroskopowa wpływu pośredniej współhodowli OHC z WJ-MSC lub WJ-EPC na śmiertelność komórek w regionie CA1. Martwe komórki wyznakowano jodkiem propidyny (czarny), a następnie wykonano zdjęcia przy pomocy mikroskopu konfokalnego. Różową strzałką zaznaczono uszkodzony region CA1 OHC. Na zdjęciach można zaobserwować zmniejszenie liczby martwych komórek we współhodowli z obydwoimi typami komórek.

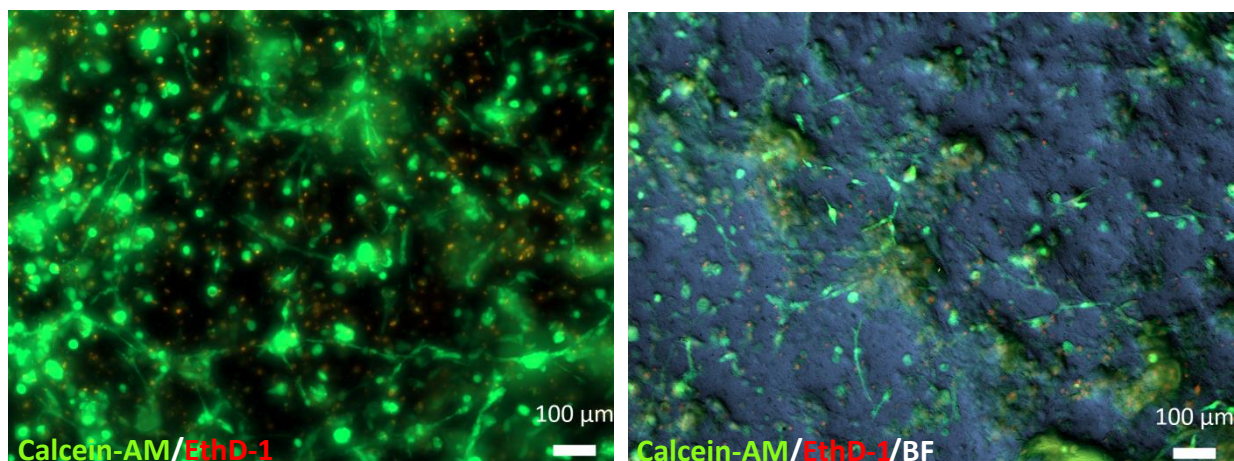


Ryc. 22. Wpływ pośredniej współhodowli OHC z WJ-MSC lub WJ-EPC na śmiertelność komórek w regionie CA1. Wykres przedstawiający procent martwych komórek w regionie CA1 w poszczególnych wariantach doświadczalnych. W wyniku współhodowli obserwuje się zwiększenie przeżywalności komórek w regionie CA1 OHC-OGD. Każda wartość jest średnią uzyskaną z analizy hipokampów pięciu zwierząt, przy trzech powtórzeniach każdego oznaczenia. Analizę statystyczną wykonano przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu Bonferroni. (\pm SEM, $n=5$, * - dla p mieszczącego się w przedziale $0,01 < p < 0,05$; ** - $0,001 < p < 0,01$; ***- $0,0001 < p < 0,001$).

5.3. Doświadczenia in vivo

5.3.1. Ocena wpływu hodowli w trójwymiarowych szkieletach z lizatu płytkowego na morfologię WJ-MSC

W kolejnych doświadczeniach oceniano wpływ hodowli na rusztowaniach 3D na morfologię mezenchymalnych komórek macierzystych. W tym celu WJ-MSC wyznakowane znacznikiem żywych komórek Calcein-AM oraz martwych komórek EthD-1 zmieszano z lizatem płytkowym, a następnie usieciowano przy pomocy trombiny. Po 24 godzinach od założenia hodowli komórki mezenchymalne zmieniły swój kształt z kulistego na wydłużony i fibroblastyczny. Ponadto, WJ-MSC były zdolne do migracji wewnątrz rusztowania i tworzenia połączeń międzykomórkowych (Ryc. 21.).

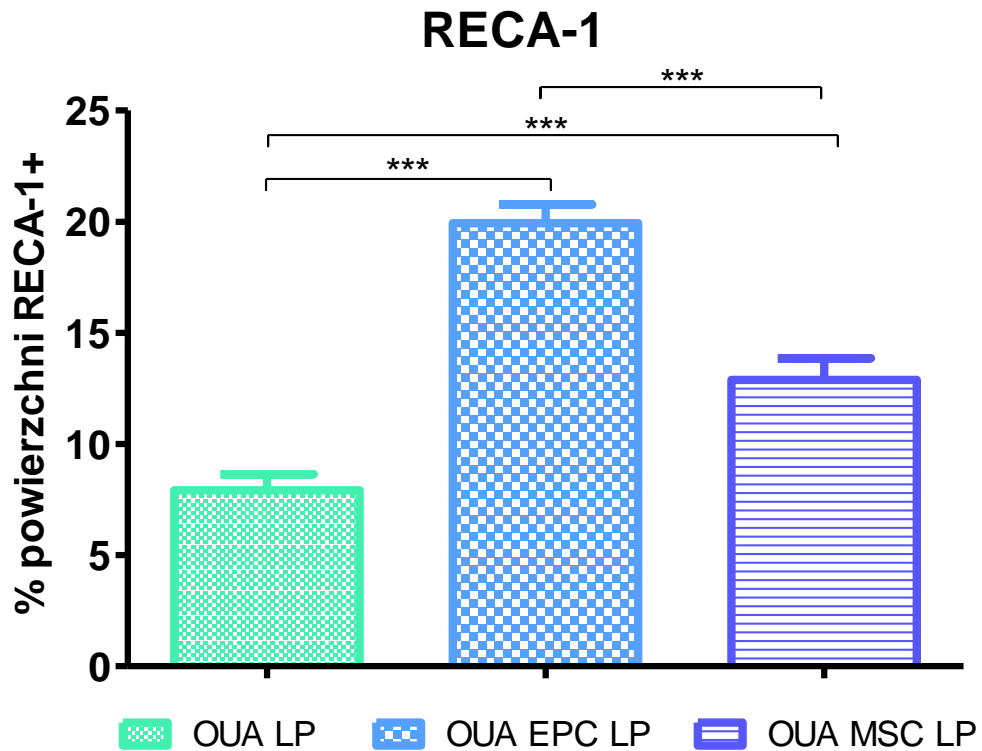


Ryc. 23. Zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiające wpływ rusztowania z lizatu płytkowego na hodowlę WJ-MSC . Komórki wybarwiono znacznikiem żywych (Calcein-AM) oraz martwych (EthD-1) komórek. Strukturę rusztowania uchwyciono poprzez połączenia fluorescencji ze światłem przechodzącym (BF, zdjęcie po prawej). Skala 100 µm.

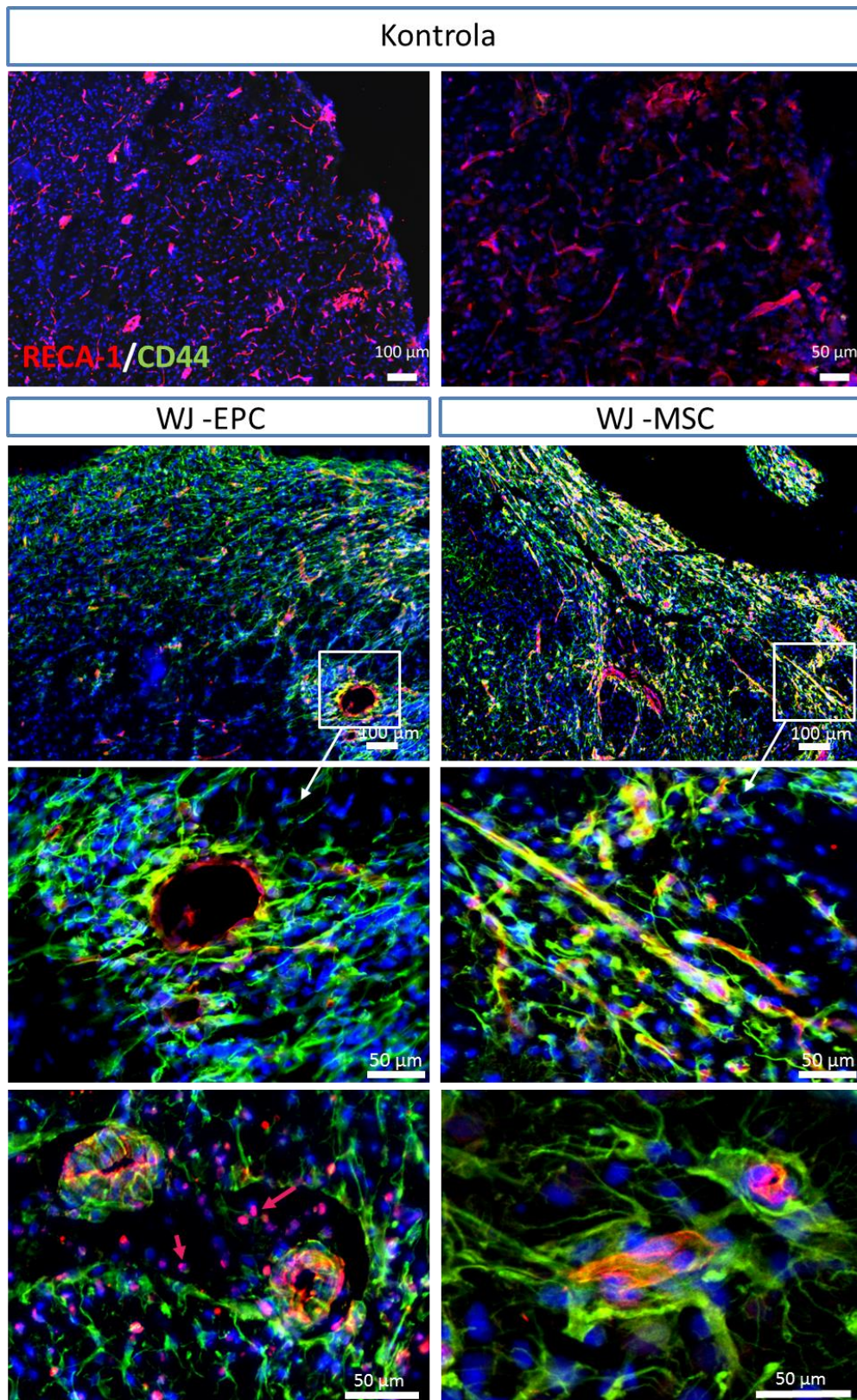
5.3.2. Działanie naczynioprotekcyjne WJ-MSC i WJ-EPC po transplantacji do prądkowia uszkodzonego przez ouabainę mózgu szczura

Działanie naczynioprotekcyjne oceniano po transplantacji WJ-MSC lub WJ-EPC osadzonych na rusztowaniach z lizatu płytkowego usieciowanego trombiną bezpośrednio przed podaniem do mózgow szczurów poddanych 3 dni wcześniej ogniskowemu uszkodzeniu OUN.

Wpływ WJ-MSC lub WJ-EPC osadzonych na szkieletach z lizatu płytkowego na naczynia krwionośne szczura był oceniany 14 dni po transplantacji do prądkowia. W tym celu przeszczepiane komórki wyznakowano specyficznym dla człowieka przeciwciałem skierowanym przeciwko CD44, a naczynia krwionośne specyficznym dla szczura markerem komórek śródbłonna RECA-1. Wyniki przedstawiono jako procent powierzchni wyznakowanej markerem RECA-1 w stosunku do zaznaczonej tkanki. Zarówno WJ-MSC jak i WJ-EPC po transplantacji wnikały do otaczającej tkanki gospodarza. W wyniku przeszczepienia komórek zaobserwowano istotne statystycznie zwiększenie gęstości naczyń krwionośnych w obrębie uszkodzonej tkanki oraz w miejscach lokalizacji WJ-MSC lub WJ-EPC. W porównaniu do kontroli, gdzie liczba naczyń krwionośnych plasowała się na poziomie 8% ($\pm 0,7\%$), u szczurów po transplantacji WJ-MSC wynosiła 13% ($\pm 0,9\%$), natomiast po przeszczepie WJ-EPC była na najwyższym poziomie 20% ($\pm 0,8\%$). Ponadto dzięki wizualizacji mikroskopowej zaobserwowano, że WJ-MSC i WJ-EPC otaczają naczynia krwionośne. Co więcej w przypadku transplantacji WJ-EPC, w tkance otaczającej uszkodzenie zaobserwowano pojedyncze komórki reagujące pozytywnie z przeciwciałem skierowanym przeciwko RECA-1, prawdopodobnie będące progenitorami komórek śródbłonna (Ryc. 22. i 23.).



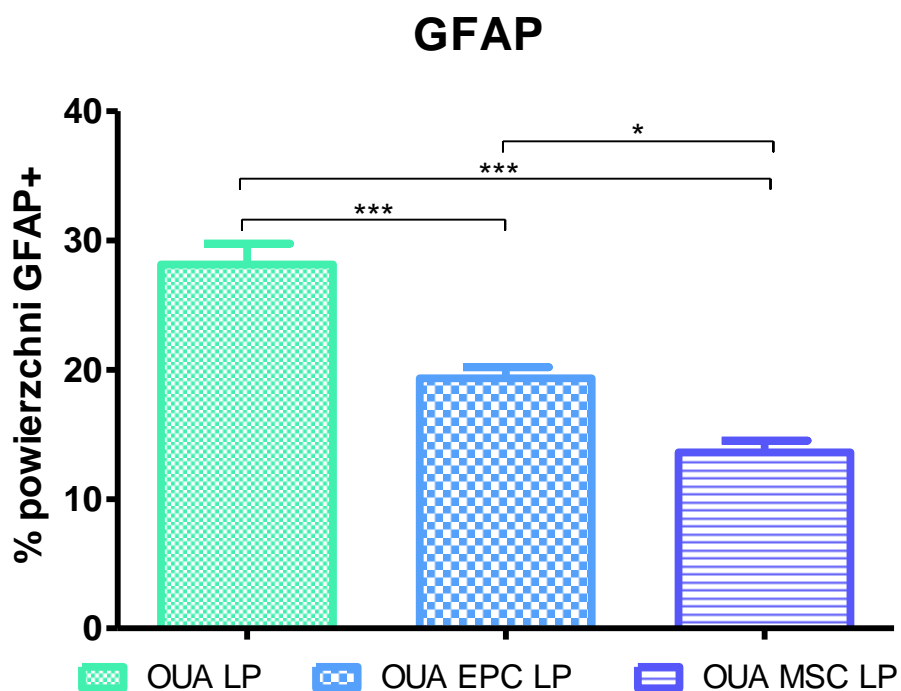
Ryc. 24. Ocena wpływu transplantacji WJ-MSC i WJ-EPC na naczynia krwionośne w prążkowiu uszkodzonego ouabainą mózgu szczura. Wykres przedstawiający porównanie gęstości naczyń krwionośnych po transplantacji WJ-MSC lub WJ-EPC w porównaniu do kontroli. Wyniki obrazują średnie z czterech niezależnych eksperymentów, przy czterech powtórzeniach każdego oznaczenia. LP – rusztowanie z lizatu płytkowego. Analizę statystyczną wykonano przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu Bonferroni. (\pm SEM, $n=4$, * - dla p mieszczącego się w przedziale $0,01 < p < 0,05$; ** - $0,001 < p < 0,01$; ***- $0,0001 < p < 0,001$).



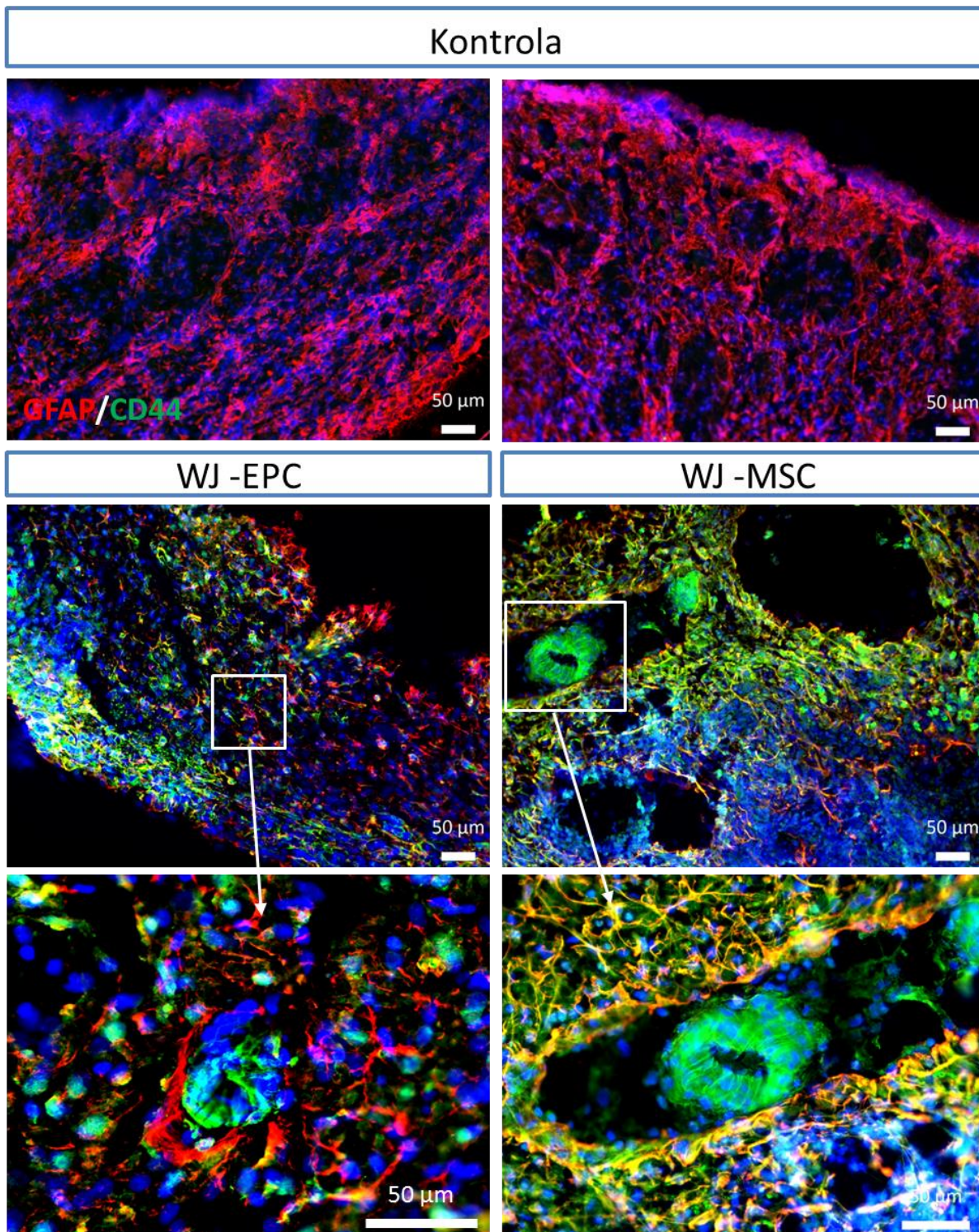
Ryc. 25. Zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego wizualizujące wzajemne oddziaływanie przeszczepionych WJ-MSC i WJ-EPC z naczyniami krwionośnymi w mózgu szczura. Śródbłonek szczura został uwidoczniony w reakcji ze specyficznym dla tego gatunku przeciwciałem anti- RECA-1 (czerwony), transplantowane komórki wyznakowano anty-ludzkim markerem CD44 (zielony). Czerwoną strzałką zaznaczono pojedyncze komórki wykazujące obecność markera RECA-1. Jądra komórek zabarwiono na niebiesko za pomocą Hoechst 33258.

5.3.3. Wpływ transplantacji WJ-MSC i WJ-EPC na tworzenie blizny glejowej w prążkowie szczura po uszkodzeniu mózgu ouabainą

Ocena hamowania tworzenia blizny glejowej przez mezenchymalne komórki macierzyste była wykonywana po 14 dniach od transplantacji. Wyniki przedstawiono jako procent powierzchni tkanki pozytywnie reagującej z przeciwciałem skierowanym przeciwko GFAP. W wyniku transplantacji liczba komórek wykazujących obecność GFAP istotnie spadła w porównaniu do kontroli (28% ($\pm 1,6\%$)) w obu wariantach komórkowych, przyjmując wartości odpowiednio 19% ($\pm 0,9\%$) dla WJ-EPC i 14% ($\pm 0,8\%$) dla WJ-MSC. Ponadto przy pomocy analizy mikroskopowej wykazano, że WJ-EPC, w odróżnieniu od WJ-MSC miały tendencję do lokalizowania się głównie w okolicy naczyń krwionośnych. WJ-MSC wykazywały natomiast pozytywną reakcję dla przeciwciała glejowego GFAP, w przeciwieństwie do WJ-EPC (Ryc. 24. i 25.).



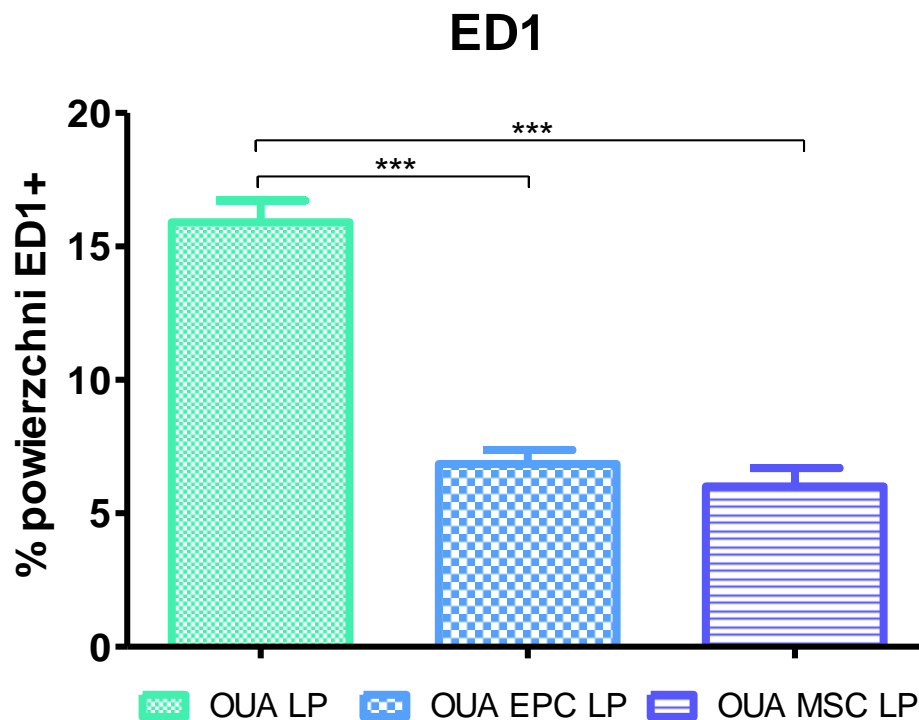
Ryc. 26. Wpływ transplantacji WJ-MSC i WJ-EPC na tworzenie blizny glejowej w prążkowie uszkodzonego ouabainą mózgu szczura. Wykres przedstawiający porównanie wielkości powierzchni tkanki wyznakowanej markerem glejowym GFAP po transplantacji WJ-MSC lub WJ-EPC w porównaniu do kontroli. W wyniku przeszczepienia WJ-MSC jak i WJ-EPC obserwuje się mniejszą liczbę komórek reagujących pozytywnie z przeciwciałem skierowanym przeciwko GFAP. Wyniki obrazują średnie z czterech niezależnych eksperymentów, przy czterech powtórzeniach każdego oznaczenia. LP – rusztowanie z lizatu płytkowego. Analizę statystyczną wykonano przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu Bonferroni. ($\pm SEM$, $n=4$, * - dla p mieszczącego się w przedziale $0,01 < p < 0,05$; ** - $0,001 < p < 0,01$; ***- $0,0001 < p < 0,001$).



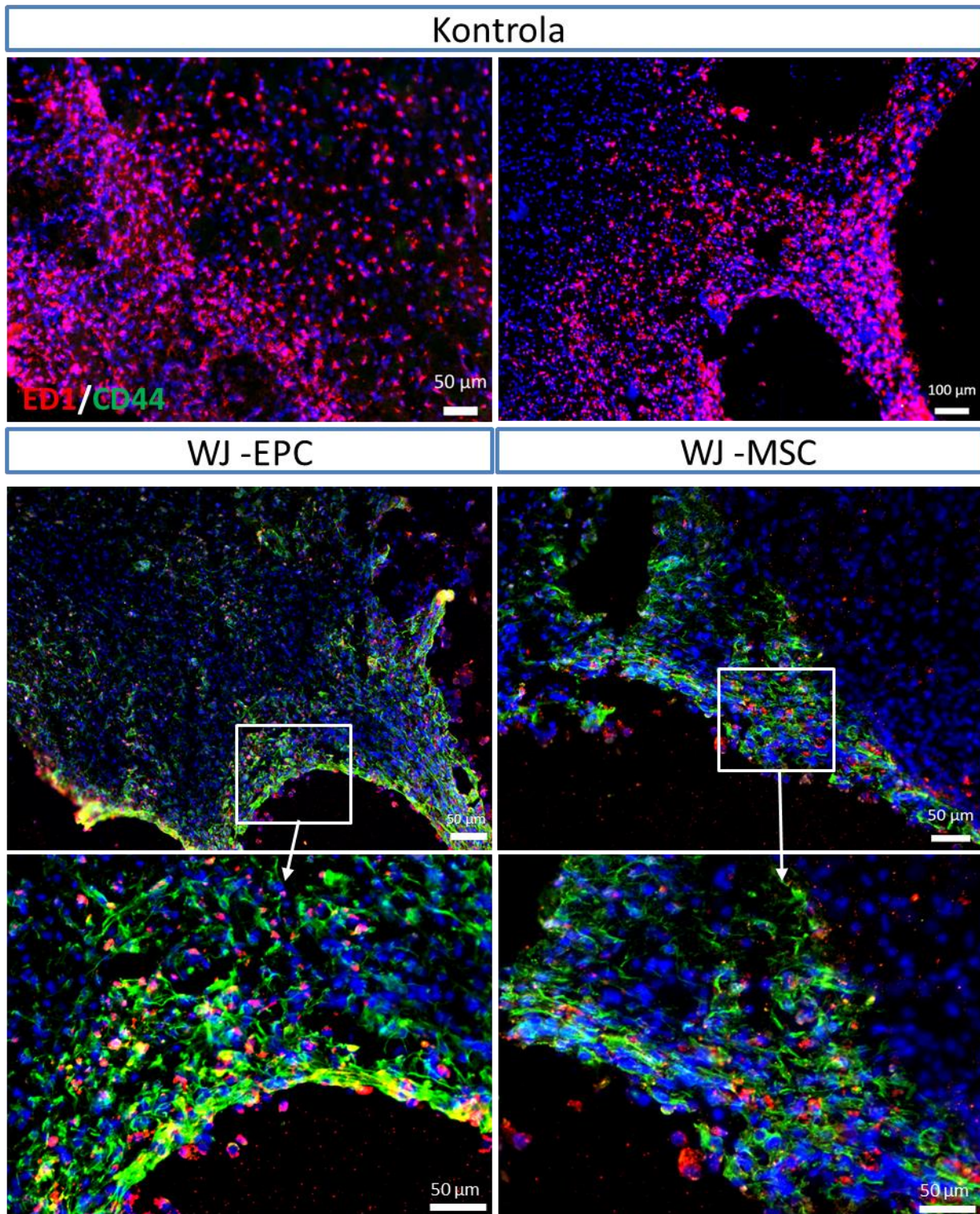
Ryc. 27. Zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego wizualizujące wzajemne oddziaływanie przeszczepionych WJ-MSC lub WJ-EPC z komórkami pozytywnie reagującymi z przeciwciałem anti-GFAP. Przeciwciało to reaguje zarówno z białkiem szczurzym jak i ludzkim. Transplantowane komórki wyznakowano markerem CD44 (zielony). W wyniku transplantacji WJ-MSC lub WJ-EPC obserwuje się zmniejszenie liczby komórek posiadających w swoich strukturach białko GFAP (czerwony). WJ-EPC lokalizują się głównie w okolicy naczyń krwionośnych. Rozmieszczenie WJ-MSC jest bardziej równomierne a same komórki w dużej mierze wykazują również obecność GFAP w swoich strukturach. Jądra komórek zostały wyznakowane na niebiesko za pomocą Hoechst 33258.

5.3.4. Porównanie reakcji zapalnej po transplantacji WJ-MSC i WJ-EPC w prążkowiu szczura po uszkodzeniu mózgu ouabainą

Po 14 dniach od transplantacji WJ-MSC lub WJ-EPC transplantowanych wraz z tworzącymi się w tkance szkieletami 3D z lizatu płytkowego do uszkodzonego ouabainą mózgu szczurów, obserwowano aktywację komórek odpowiedzi immunologicznej biorcy przeszczepu. W tkance nerwowej w kontroli w okolicy uszkodzenia zaobserwowano liczne (16% (\pm 0,8%)) komórki reagujące pozytywnie z przeciwciałami skierowanymi przeciwko ED1 (marker makrofagów/mikrogleju). W wyniku transplantacji liczba komórek reagujących pozytywnie z przeciwciałem anty-ED1 istotnie statystycznie zmniejszyła się i wynosiła odpowiednio, 7% (\pm 0,53%) dla WJ-EPC oraz 6% (\pm 0,68%) dla WJ-MSC (Ryc. 26. i 27.).



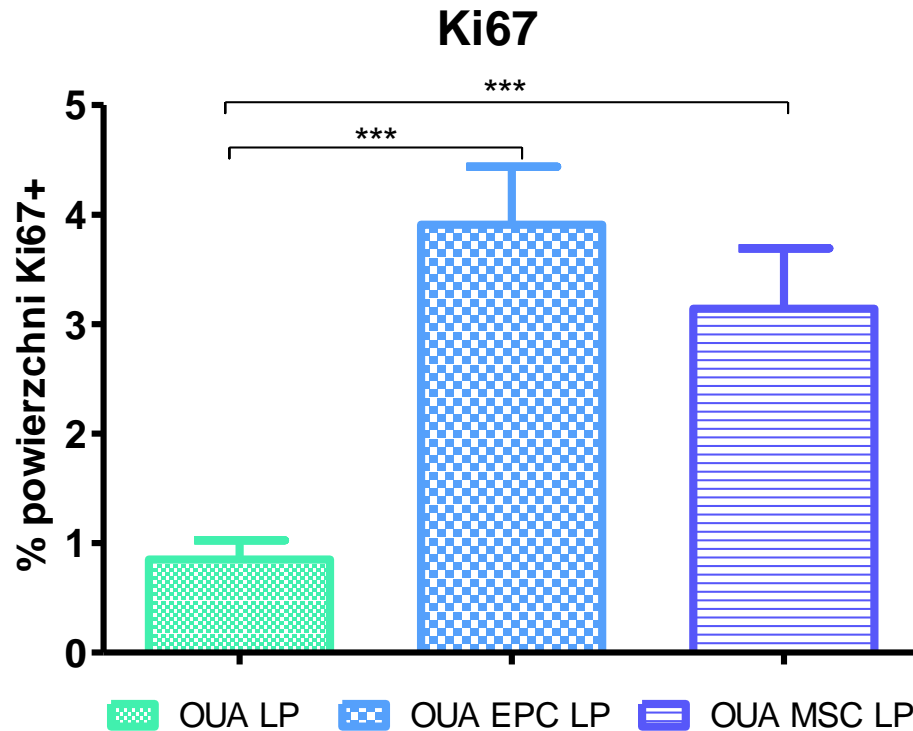
Ryc. 28. Hamowanie odpowiedzi immunologicznej biorcy przez WJ-MSC lub WJ-EPC. Wykres przedstawiający wpływ przeszczepionych komórek na liczbę komórek mikrogleju reagujących z przeciwciałem ED1. W wyniku transplantacji obu typów komórek obserwuje się zmniejszenie lokalnej reakcji zapalnej. Wyniki obrazują średnie z czterech niezależnych eksperymentów, przy czterech powtórzeniach każdego oznaczenia. LP – rusztowanie z lizatu płytkowego. Analizę statystyczną wykonano przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu Bonferroni. (\pm SEM, $n=4$, * - dla p mieszczącego się w przedziale $0,01 < p < 0,05$; ** - $0,001 < p < 0,01$; ***- $0,0001 < p < 0,001$).



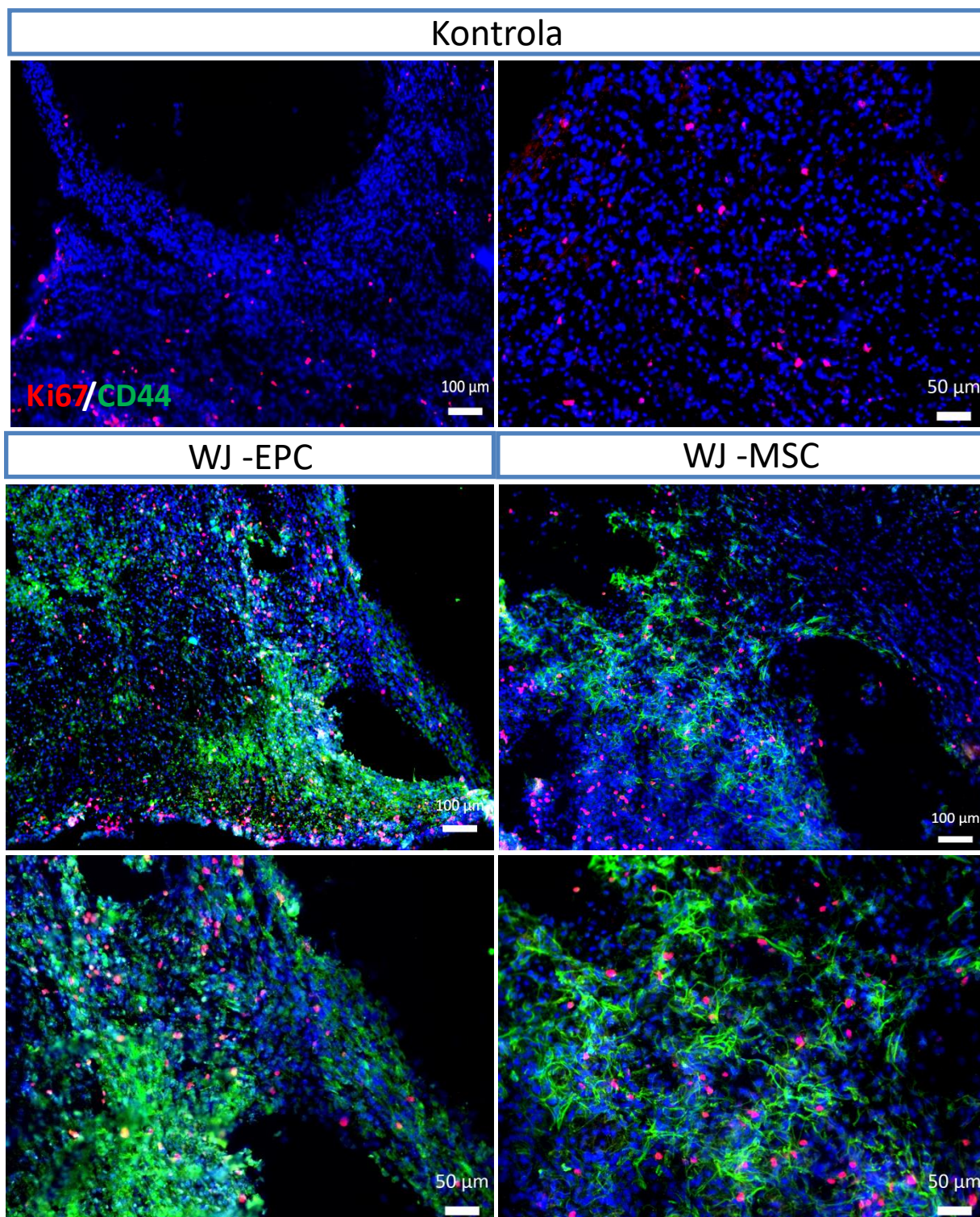
Ryc. 29. Wpływ transplantowanych komórek na aktywację mikrogleju. Zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiające zwiększoną odpowiedź zapalną w mózgu po uszkodzeniu wywołanym ouabainą w stosunku do odpowiedzi w wariacie z przeszczepionymi komórkami WJ-MSC lub WJ-EPC. Na czerwono wyznakowano komórki odpowiedzi zapalnej pozytywne dla ED1, transplantowane komórki odznaczają się kolorem zielonym dzięki pozytywnej reakcji ze specyficznym dla człowieka przeciwciałem skierowanym przeciwko CD44. Jądra komórkowe wyznakowano przy pomocy Hoechst 33258

5.3.5. Wpływ transplantowanych WJ-MSC i WJ-EPC na proliferację komórek w uszkodzonym ouabainą prążkowi mózgu szczura

Ocenę liczby proliferujących komórek w prążkowie w okolicy uszkodzenia prowadzono po 14 dniach od transplantacji komórek WJ-MSC lub WJ-EPC. W wyniku transplantacji zaobserwowano istotne statystycznie zwiększenie liczby proliferujących komórek, kolejno 4% ($\pm 0,53\%$) dla WJ-EPC i 3% ($\pm 0,55\%$) dla WJ-MSC w porównaniu do kontroli 0,8% ($\pm 0,2\%$) (Ryc. 28. i 29.).



Ryc. 30. Stymulacja proliferacji w prążkowie uszkodzonym ouabainą przez WJ-MSC i WJ-EPC. Wykres przedstawiający wpływ przeszczepionych WJ-MSC i WJ-EPC na liczbę proliferujących komórek pozytywnie reagujących z przeciwciałem Ki67. W wyniku transplantacji obu typów komórek wzrasta liczba proliferujących komórek szczura (czerwonych) w prążkowie. Wyniki obrazują średnie z czterech niezależnych eksperymentów, przy czterech powtórzeniach każdego oznaczenia. LP – rusztowanie z lizatu płytkowego. Analizę statystyczną wykonano przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu Bonferroni. ($\pm SEM$, $n=4$, * - dla p mieszczącego się w przedziale $0,01 < p < 0,05$; ** - $0,001 < p < 0,01$; ***- $0,0001 < p < 0,001$).

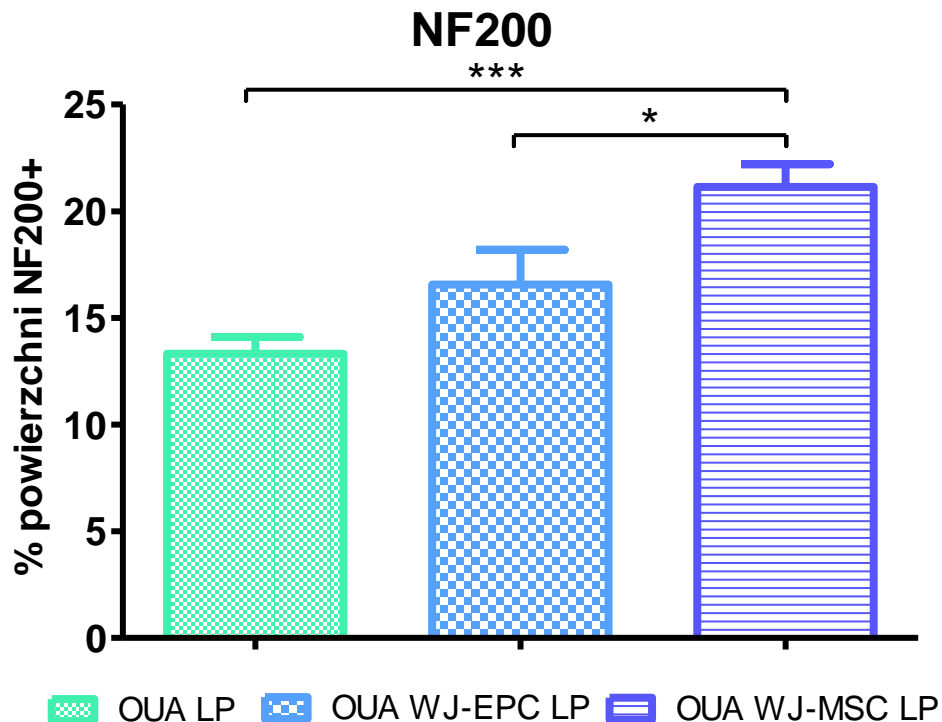


Ryc. 31. Wpływ transplantowanych komórek na stymulację proliferacji w uszkodzonym OUA prążkowie mózgu szczura. Zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiające zwiększenie liczby proliferujących komórek w wyniku transplantacji WJ-MSC lub WJ-EPC osadzonych na szkieletach z lizatu płytkowego. Komórki pozytywnie reagujące z markerem proliferacji Ki67 (czerwony), WJ-MSC i WJ-EPC wyznakowano CD44 (zielony). Jądra komórkowe wyznakowano przy pomocy Hoechst 33258. Nieliczne komórki wykazują dwubarwność (żółte) co dowodzi słabej proliferacji ludzkich komórek MSC w miejscu przeszczepu.

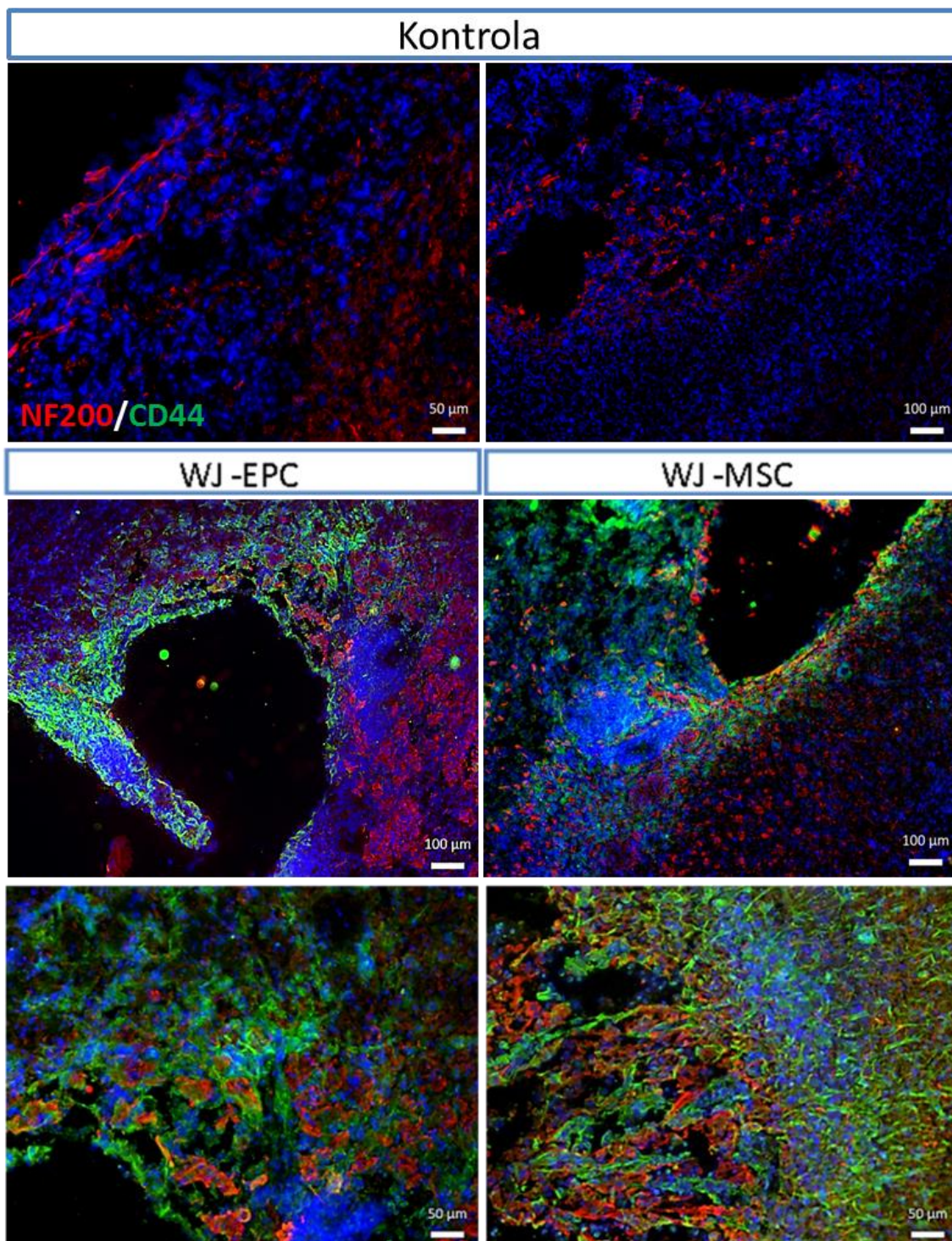
5.3.6. Ocena potencjału neuralnego transplantowanych do prążków mózgu szczura WJ-MSC i WJ-EPC

Analizę potencjału neuralnego oceniono po 14 dniach od transplantacji WJ-MSC lub WJ-EPC na podstawie reakcji z przeciwciałami skierowanymi przeciwko specyficznemu dla człowieka wczesnemu markerowi neuralnemu nestynie oraz markerowi dojrzałych neuronów NF200 wiążącym się zarówno z ludzkimi jak i szczurzymi białkami. W wyniku transplantacji WJ-MSC zaobserwowano istotny statystycznie wzrost liczby komórek wykazujących obecność markera NF200 (21,14% (\pm 1%)) w porównaniu do kontroli (13,32% (\pm 0,8%)) (Ryc. 30.). Zwiększenie liczby komórek pozytywnych dla tego markera po transplantacji WJ-EPC (16,57% (\pm 1,6%)) było nieistotne statystycznie. Nie zaobserwowano współwystępowania markera CD44 z NF200 (Ryc. 31.).

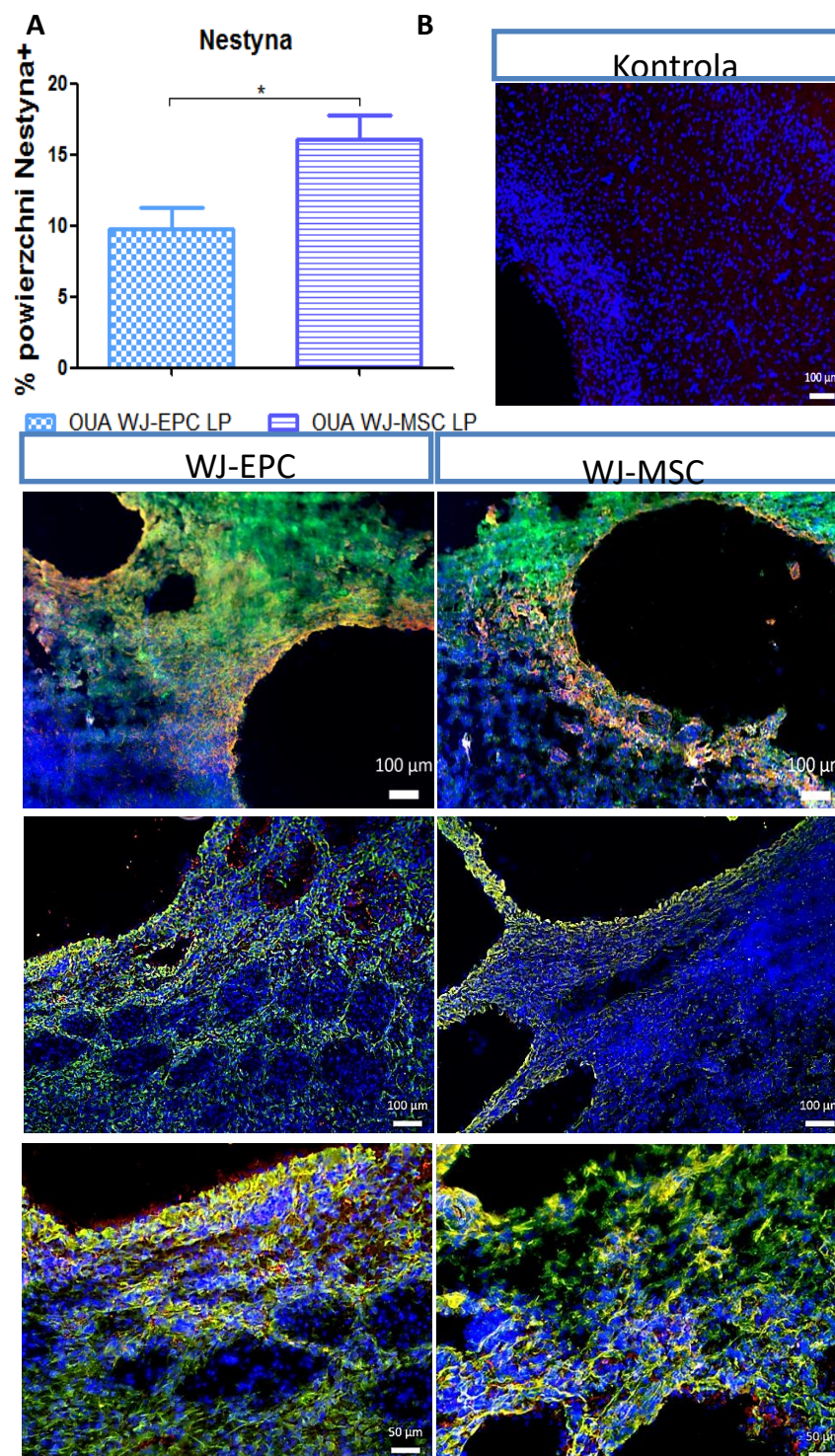
W wyniku transplantacji, w odpowiedzi na panujące warunki mikrośrodowiska, część WJ-MSC jak i WJ-EPC wykazywała obecność nestyny. Reakcja ta była wyraźniejsza po transplantacji WJ-MSC w przypadku których 16,1% (\pm 1,7%) komórek reagowało pozytywnie z przeciwciałem skierowanym przeciwko nestynie, w przypadku WJ-EPC było to 9,8% (1,4%). Różnica między obydwoma typami komórek była istotna statystycznie (Ryc. 32.).



Ryc. 32. Potencjał neuralny WJ-MSC i WJ-EPC. Wykres przedstawiający wzrost liczby komórek pozytywnych dla NF200 w wyniku transplantacji WJ-MSC i WJ-EPC. Wyniki obrazują średnie z czterech niezależnych eksperymentów, przy czterech powtórzeniach każdego oznaczenia. LP – rusztowanie z lizatu płytkowego. Analizę statystyczną wykonano przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu Bonferroni. (\pm SEM, $n=4$, * - dla p mieszczącego się w przedziale $0,01 < p < 0,05$; ** - $0,001 < p < 0,01$; *** - $0,0001 < p < 0,001$).



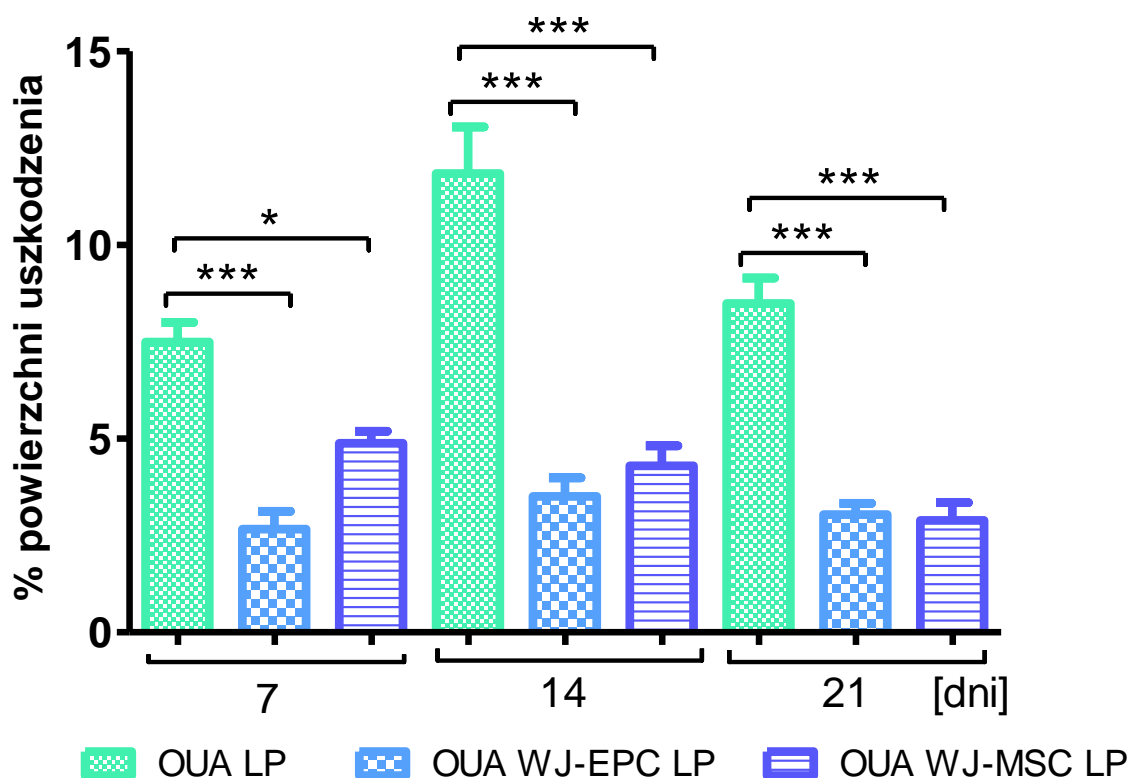
Ryc. 33. Potencjał neuronalny WJ-MSC i WJ-EPC. A/ Reprezentatywne zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiające zwiększenie liczby komórek reagujących pozytywnie z przeciwciałem NF200 (czerwony) w wyniku transplantacji WJ-MSC lub WJ-EPC osadzonych na szkieletach z lizatu płytkowego. NF200 daje stosunkowo mało reakcji dwubarwnej (żółtej) więc wzrost czy też osłona przed śmiercią niedokrwienną dotyczy głównie endogennych komórek szczura, co również potwierdza kontrola. WJ-MSC i WJ-EPC wyznakowano CD44 (zielony). Jądra komórkowe zabarwiono przy pomocy Hoechst 33258.



Ryc. 34. Potencjał neuralny WJ-MSC i WJ-EPC. *A/ Wykres przedstawiający porównanie liczby transplantowanych komórek reagujących pozytywnie z przeciwciałem skierowanym przeciwko nestynie. Wyniki obrazują średnie z czterech niezależnych eksperymentów, przy czterech powtórzeniach każdego oznaczenia. B/ Zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego wykazujące różnicowanie w kierunku neuralnym części transplantowanych WJ-MSC i WJ-EPC. W obu typach komórek zaobserwowano współwystępowanie markera CD44 (zielony) oraz nestyny (czerwony). W kontroli nie wykazano obecności nestyny, co potwierdza że pojawia się ona głównie na komórkach pochodzenia ludzkiego. Jądra komórkowe wyznakowano przy pomocy Hoechst 33258. LP – rusztowanie z lizatu płytkowego. Analizę statystyczną wykonano przy pomocy testu t Studenta (\pm SEM, $n=4$, * - dla p mieszczącego się w przedziale $0,01 < p < 0,05$; ** - $0,001 < p < 0,01$; *** - $0,0001 < p < 0,001$).*

5.3.7. Porównanie wielkości uszkodzenia wywołanego ouabainą po transplantacji WJ-EPC i WJ-MSC

Wielkość uszkodzenia powstałego w wyniku podania ouabainy była oceniana po 7, 14 oraz 21 dniach od transplantacji WJ-MSC lub WJ-EPC z lizatem płytkowym. W 14 dniu obserwowano największe uszkodzenie tkanki nerwowej wynoszące 12% ($\pm 1,2\%$) powierzchni mózgu, w porównaniu do dnia 7. (7,5% ($\pm 0,5\%$)) oraz dnia 21. (8,5% ($\pm 0,6\%$)). Transplantacja ludzkich WJ-MSC i WJ-EPC do uszkodzonego prążkowiec mózgu szczura skutkowała istotnym zmniejszeniem wielkości uszkodzenia we wszystkich wariantach czasowych w porównaniu do zwierząt którym podano jedynie lizat płytkowy. W dniu 7. po transplantacji WJ-EPC wynosiła 2,7% ($\pm 0,5\%$), natomiast po podaniu WJ-MSC uszkodzone było 4,9% ($\pm 0,3\%$) tkanki. Po 14 dniach od przeszczepu wielkość uszkodzenia wynosiła 3,5% ($\pm 0,4\%$) dla WJ-EPC oraz 4,3% ($\pm 0,52\%$) dla WJ-MSC. Natomiast po 21 dniach powierzchnia uszkodzenia tkanki nerwowej była prawie na równym poziomie 3% ($\pm 0,3\%$) dla WJ-EPC i 2,9% ($\pm 0,46\%$) dla WJ-MSC (Ryc. 33).



Ryc. 35. Porównanie wielkości uszkodzenia prążkowiec mózgu szczura spowodowanego podaniem ouabainy po transplantacji WJ-EPC i WJ-MSC. Ocenę prowadzono w 7., 14. i 21. dniu po transplantacji WJ-MSC lub WJ-EPC. W wyniku transplantacji obserwuje się istotne zmniejszenie wielkości uszkodzenia. Liczby obrazują średnie z 4 zwierząt przypadających na każdy punkt czasowy, wyrażone jako % powierzchni uszkodzenia w stosunku do powierzchni całego mózgu. LP – rusztowanie z lizatu płytkowego. Analizę statystyczną wykonano przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu Bonferroni. (\pm SEM, $n=4$, * - dla p mieszczącego się w przedziale $0,01 < p < 0,05$; ** - $0,001 < p < 0,01$; ***- $0,0001 < p < 0,001$).

Pełna regeneracja składowych jednostki neuronaczyniowej jest podstawą przywrócenia prawidłowych funkcji OUN po epizodzie niedokrwiennym. Niezwykle istotna jest odbudowa zarówno sieci neuralnych jak i naczyń. Wprawdzie w stanach patologicznych obserwuje się wzrost proliferacji, a następnie migracji progenitorów neuralnych czy śródbłonkowych do miejsca uszkodzenia niedokrwiennego, jednak ich działanie jest niewystarczające. Może być to związane zarówno z wpływem nieprzyjaznego środowiska zapalnego w obrębie uszkodzonej tkanki, aktywnością astrocytów, które poza tworzeniem blizny gwałtownej wydzielają również hamujące wzrost czynniki, czy niedostateczną proliferacją endogennych progenitorów. Zastosowanie mezenchymalnych komórek macierzystych rodzi wiele nadziei w terapii udaru niedokrwiennego mózgu, ale wymaga szczegółowej optymalizacji. Prowadzone do tej pory badania kliniczne wykazały bezpieczeństwo stosowania MSC, jednak pozytywne efekty transplantacji były stosunkowo niespójne i niewystarczające. Poznanie mechanizmów działania MSC umożliwi bardziej świadome wdrażanie ich do kliniki oraz otwiera możliwość regulacji ich poszczególnych właściwości regeneracyjnych w zależności od potrzeb terapii.

Jednym z głównych celów prezentowanej pracy doktorskiej była ocena właściwości naczynio- i neuro-protektoryjnych mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z galarety Whartona (WJ-MS) oraz próba zwiększenia ich zdolności regeneracyjnych poprzez różnicowanie w kierunku progenitorów śródbłonkowych (WJ-EPC). Praca została podzielona na trzy etapy *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo*.

W zależności od wyboru metody izolacji: mechanicznej bądź enzymatycznej uzyskuje się populacje MSC o zróżnicowanym charakterze. Na podstawie własnych obserwacji i wyników pracy naszego zespołu do izolacji WJ-MS wybrano metodę mechaniczną. Według pracy naszej grupy Lech i wsp. (2016) mezenchymalne komórki macierzyste wyizolowane mechanicznie cechują się wyższym potencjałem proliferacyjnym, zwiększoną zdolnością do różnicowania w kierunku mezodermalnym oraz wolniejszym starzeniem w porównaniu do MSC po trawieniu enzymatycznym (Lech i in., 2016). Potwierdzono również wcześniejsze obserwacje Drela i wsp. (2014 i 2016), w których wykazano że nietrawione WJ-MS cechują się zwiększonym potencjałem do spontanicznego różnicowania neuralnego (Lech i in., 2016; Drela i in., 2014, 2016). Zgodnie z wynikami innych badaczy w wyniku izolacji mechanicznej galarety Whartona ze sznura pępowiny, a następnie kilkudniowej inkubacji w pożywce wzrostowej MSCGM w naczynku hodowlanym otrzymano komórki o cechach typowych dla MSC, spełniających wytyczne Międzynarodowego Towarzystwa Terapii Komórkowej (ang. International Society for Cellular Therapy, ISCT) (Horwitz i in., 2005; Lech i in., 2016). Po około 7-14 dniach od rozpoczęcia inkubacji galarety Whartona na powierzchni naczynka hodowlanego pojawiły się adherentne, wrzecionowate komórki przypominające fibroblasty. Podobnie jak w pracy Drela i wsp. (2014), otrzymane tą metodą MSC były zdolne do tworzenia centr intensywnej proliferacji (CFU) i namnażania się, z czasem zarastając całą dostępną powierzchnię wzrostu, tworząc jednolitą hodowlę zlewną tzw. *monolayer*. Przy pomocy cytometrii przepływowej potwierdzono również obecność typowych markerów „pozytywnych” dla mezenchymalnych komórek macierzystych CD90, CD73 i CD105 oraz brak markerów „negatywnych” CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR. Ostatnim

kryterium potwierdzającym charakter MSC wyizolowanych komórek jest ich zdolność do różnicowania w kierunku komórek tkanki kostnej, chrzęstnej i tłuszczowej. Zgodnie z wcześniejszymi wynikami Drela i wsp. (2014 i 2016) oraz Lech i wsp. (2016) wykazaliśmy że mechanicznie wyizolowane WJ-MSC w wyniku inkubacji z mediami kierującymi wykazują potencjał do różnicowania w kierunku chondrocytów, osteocytów i adipocytów (Drela i in., 2014; Lech i in., 2016; Drela i in., 2016).

Jedną z ważniejszych cech komórek macierzystych w aspekcie terapeutycznym jest ich wysoka plastyczność i zdolność do różnicowania w różne typy komórek. Podatność do różnicowania MSC *in vitro* w linii pochodzące ze wszystkich trzech listków zarodkowych wciąż rodzi liczne debaty i wątpliwości. Jak już wspomniano, WJ-MSC jako komórki pochodzące z płodu cechują się bardziej prymitywnym fenotypem rozwojowym (tzw. embryonic-like), czego dowodem jest ekspresja pluripotencjalnych markerów komórek embrionalnych: Oct4, SSEA-4, Nanog, Sox-2. Z tego też względu posiadają rozszerzony zakres dalszego, indukowanego *in vitro* różnicowania w komórki pochodzące zarówno z mezodermy, jak i neuroendodermy i endodermy (Kalaszczynska i Ferdyn, 2015; Maslova, Novak i Kruzliak, 2015). Wykazano również, że komórki te cechują się zdolnością do samoistnego neuralnego różnicowania, czego nie zaobserwowano w populacjach MSC pochodzących z innych źródeł (Drela i in., 2016).

Odbudowa struktury i funkcji uszkodzonych naczyń krwionośnych jest niezbędnym elementem regeneracji niedokrwiennej mózgu. Według ostatnich badań endogenne progenitory endotelialne w wyniku udaru niedokrwiennego są uwalniane ze szpiku do krwi krążącej, skąd wspólnie z progenitorami EPC występującymi w tzw. niszach okołonaczyniowych migrują do miejsca uszkodzenia, gdzie biorą udział w odbudowie mikronaczyń i przywróceniu prawidłowego funkcjonowania uszkodzonej jednostki neuronaczyniowej (Aguilera i in., 2014; Wei, Erinjeri, Rovainen i Woolsey, 2001; Asahara i in., 1999; Sharma i in., 2012). W licznych badaniach wykazano, że w wyniku niedokrwienia mózgu dochodzi do wzmożonej proliferacji progenitorowych komórek endotelialnych, a ich duża liczba pojawiająca się w krwi obwodowej koreluje z pozytywnym poudarowym przebiegiem klinicznym (Sobrinho i in., 2007). Udostępnienie dodatkowego źródła funkcjonalnych progenitorów endotelialnych w postaci przeszczepów komórek WJ-EPC daje nadzieje na zmniejszenie deficytów poudarowych i szybszą rekonwalescencję. Wykazano jednak, że wyizolowane z naczyń krwionośnych komórki śródbłonna pomimo proliferacji *in vitro*, w trakcie hodowli tracą swoje właściwości co wyklucza je z zastosowania klinicznego (Prasad Chennazhy i Krishnan, 2005). Istnieje również możliwość pozyskania EPC z krwi obwodowej, jednak w stanie fizjologicznym są one niezwykle rzadkim i trudnym w hodowli materiałem (Tagawa i in., 2015). Ponadto w badaniach *in vivo* Portalska i wsp. (2012) po podskórnym wszczepieniu rusztowań z PLLA (Poli-L-laktyd) lub PLGA (kopolimer kwasu mlekowego z kwasem glikolowym), na których dwa tygodnie wcześniej założono hodowle ludzkiej linii komórek śródbłonna HUVEC, nie zaobserwowali tworzenia prawidłowych struktur naczynia krwionośnego. Badacze ci sugerują, że HUVEC nie są w stanie bez wsparcia innych komórek, takich jak perycyty czy komórki mięśni gładkich, stworzyć stabilnej struktury naczynia krwionośnego. W tych samych badaniach po transplantacji różnicowanych śródbłonnkowo BM-MSC, zaobserwowano powstanie kompletnego i funkcjonalnego naczynia krwionośnego (Portalska i in., 2012). Wydaje się więc, że mniej zróżnicowane acz ukierunkowane śródbłonnkowo mezenchymalne komórki macierzyste/progenitorowe są lepszym kandydatem do odbudowy i tworzenia funkcjonalnych sieci naczyniowych niż w pełni zróżnicowane

komórki śródbłonka. Istnieje szereg publikacji opisujących zdolność do różnicowania komórek macierzystych do linii śródbłonkowej, jednak tylko nieliczne dotyczą WJ-MSC (Oswald i in., 2004; Chen i in., 2009; Deng i in., 2015; Portalska i in., 2012).

Podstawowym zadaniem pierwszego etapu badań *in vitro* była ocena potencjału WJ-MSC do różnicowania w kierunku śródbłonka. Według Tagawa i wsp. (2015) wczesne progenitory śródbłonkowe (ang. Early Endothelial Progenitor Cells, eEPC), w czasie pierwszych kilku dni w warunkach *in vitro*, tworzą kolonię wydłużonych, wrzecionowatych komórek i mają ograniczony potencjał proliferacyjny, natomiast późne EPC, 3-4 tygodni od rozpoczęcia hodowli 2D, cechują się szybkim wzrostem oraz sześciennym kształtem, przypominającym kostkę brukową tzw. „cobblestone” (Tagawa i in., 2015; Yoo i in., 2005). Czas w jakim wczesne progenitory śródbłonka przechodzą w późne EPC *in vitro* nie jest do końca poznany i różni się w poszczególnych publikacjach. Przykładowo w przeciwieństwie do Tagawa w pracy Cheng i wsp. (2013), komórki wczesne obserwuje się w hodowli do tygodnia, natomiast późne od 2-4 tygodnia (Cheng i in., 2013). W opisywanych przez nas badaniach WJ-MSC po etapie namnażania po ok. 30 DIV były poddawane 7-dniowemu różnicowaniu *in vitro* i w dalszej części doświadczeń były określane jako WJ-EPC. W wyniku ukierunkowania śródbłonkowego WJ-EPC nabrały zróżnicowanego, endotelialnego fenotypu. Komórki te ponad trzykrotnie zmniejszyły swoją powierzchnię w stosunku do WJ-MSC, a w całej populacji można było wyróżnić zarówno podłużne, wrzecionowate komórki charakterystyczne dla eEPC, jak i takie o sześciennym kształcie, przypominające późne EPC. Te obserwacje zgodne z Cheng i wsp. (2013) sugerują, że okolice siódmego dnia są momentem przejściowym pomiędzy wczesnymi oraz późnymi progenitorowymi komórkami śródbłonka. Z drugiej strony WJ-EPC, podobnie jak WJ-MSC, wykazywały zdolność do tworzenia centrów o intensywnej proliferacji, co według Guan i wsp. (2013) jest cechą charakterystyczną dla eEPC (Guan i in., 2013). Zmianie uległo również tempo proliferacji, co jest zgodne z doniesieniami innych badaczy różnicujących mezenchymalne komórki macierzyste w kierunku śródbłonka (Oswald i in., 2004; Chen i in., 2009; Deng i in., 2015; Portalska i in., 2012). Wykazano że WJ-EPC w czasie 7-dniowej hodowli, podwajają swoją populację ponad pięciokrotnie szybciej w porównaniu do komórek nieróżnicowanych.

Według części badaczy, do określenia komórek mianem **progenitorowych komórek śródbłonka** niezbędna jest ekspresja CD34, VEGFR-2 i CD133. Jednak do dnia dzisiejszego nie dowiedziono możliwości zróżnicowania takich komórek w dojrzałe EC *in vitro* (Cheng i in., 2013). Ponadto według części badaczy istnieje subpopulacja wczesnych EPC pozbawiona ekspresji tych sugerowanych „typowych” markerów śródbłonkowych CD34 i CD133. Są to adherentne komórki, które poza markerami śródbłonkowymi cechują się obecnością markerów typowych dla MSC lub monocytów (Fan i in., 2010). Co interesujące w przedstawianych przez nas badaniach, WJ-EPC pomimo różnicowania zachowały charakterystyczny dla MSC profil ekspresji genów zalecany przez ISCT. Ponad 90% WJ-EPC posiadało na swojej powierzchni CD90, CD73 i CD105 (*de facto* marker śródbłonkowy), przy braku obecności CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR. Ze względu na istotny udział w procesie dojrzewania EPC i w angiogenezie, wybranymi przez nas markerami charakteryzującymi zróżnicowane progenitory śródbłonkowe były: PECAM-1, vWF, VCAM-1, VEGFR-2, VEGF-A. W prezentowanej pracy przyjęliśmy PECAM-1 jako marker wczesnych, natomiast vWF jako marker późnych progenitorów śródbłonkowych. Jednak taka klasyfikacja budzi kontrowersje. Według zdecydowanej większości badań PECAM-1 jest traktowany jako wczesny marker EPC, którego ekspresja spada wraz z czasem hodowli (Hur i in., 2004; Yoo i in., 2005). Jednak w części badań

wskazuje się, że PECAM-1 pojawia się dopiero w późnych EPC (Oswald i in., 2004). Mniej wątpliwości wzbudza vWF który przez większość badaczy jest uznawany jako marker późny, którego ekspresja jest indukowana dopiero w 7 dniu różnicowania śródbłonkowego MSC (Yoo i in., 2005). W opisywanych przez nas wynikach obserwowano indukcję ekspresji specyficznych markerów śródbłonkowych PECAM-1 i vWF w wyniku różnicowania WJ-EPC. W przypadku pierwszego markera poziom mRNA po różnicowaniu wzrósł 14-krotnie, natomiast drugiego 4-krotnie w porównaniu do WJ-MSC. Jest to zgodne z badaniami Zhang i wsp. (2011), w których MSC pochodzące z tkanki tłuszczowej były różnicowane w kierunku śródbłonka przez 3 tygodnie (Zhang i in., 2011). Jednoczesna ekspresja PECAM-1 i vWF potwierdza nasze wcześniejsze przypuszczenia, że w otrzymanej przez nas populacji można wyróżnić zarówno wczesne jak i późne typy EPC. Ponadto zaobserwowaliśmy również obecność markerów śródbłonkowych, takich jak: VEGFR-2, VCAM-1 oraz VEGF-A, których nieznaczną ilość wykryto również na WJ-MSC, sugerując tym samym ich stosunkowo niską specyficzność dla EPC. Podobny profil ekspresji wykazano w badaniach Chen i wsp. (2009), w których WJ-MSC różnicowane przez 12 dni w kierunku śródbłonkowym wykazywały ekspresję VEGFR-2, vWF i VE-kadheryny (Chen i in., 2009). Oswald i wsp. (2004), którzy różnicowali BM-MSC śródbłonkowo przez 7 dni, wykazali ekspresję vWF, VEGFR-1 i 2, VE-kadheryny oraz VCAM-1, ale co ciekawe przy braku ekspresji PECAM-1. W badaniach tych nie wykryto również obecności markera CD34, co jest spójne z naszymi wynikami (Oswald i in., 2004). Ze względu na krótki czas różnicowania w kierunku śródbłonka oraz powyższe wyniki skłaniamy się do twierdzenia, że otrzymana populacja WJ-EPC składa się zarówno z wczesnych jak i późnych komórek progenitorowych śródbłonka.

W celu funkcjonalnej oceny różnicowania śródbłonkowego stosowane są zróżnicowane testy w hodowli 2D i 3D, potwierdzające charakterystyczne właściwości komórek śródbłonka. Wychwyty modyfikowanej lipoproteiny niskiej gęstości (Dil-Ac-LDL) jest specyficzną cechą komórek endotelialnych i makrofagów, u których proces ten zachodzi przy pomocy receptorów zmiataczy. Ponadto EPC są zdolne do wiązania z lektyną (ang. *Ulex Europaeus Agglutinin I*, *UEA I*) oraz do tworzenia struktur pseudo-naczyniowych. W prezentowanej pracy wykazano, że w wyniku różnicowania śródbłonkowego WJ-EPC, w przeciwieństwie do WJ-MSC nabywają umiejętności inkorporacji Dil-Ac-LDL już po 4 godzinach inkubacji z odczynnikiem. Identyczne wyniki uzyskał Chen i wsp. (2009) po 12 dniach różnicowania WJ-MSC, Portalska i wsp. (2012) w wyniku 10-dniowej indukcji śródbłonkowej BM-MSC oraz Konno i wsp. (2010) po 12 dniach inkubacji ADSC z pożywką kierującą EPC (Konno i in., 2010; Portalska i in., 2012; Chen i in., 2009). Istnieje szereg protokołów oceniających potencjał angiogeny komórek śródbłonka. Najbardziej podstawowym jest test tworzenia sieci pseudo-naczyniowych przez różnicowane komórki na półstałym podłożu z kolagenu, fibryny lub macierzy zewnątrzkomórkowej (tzw. Matrigel). Układ taki ma na celu naśladowanie warunków *in vivo* i indukowanie migracji i różnicowania EPC. W wyniku wytwarzania połączeń ścisłych (ang. *tight junctions*) między komórkami dochodzi do zbudowania podobnej do naczyń krwionośnych sieci składającej się z „tubuli”, w których jednak nie obserwuje się światła. Matrigel będący mieszaniną białek błony podstawnej oraz licznych czynników wzrostowych, w tym EGF, bFGF, NGF, PDGF, IGF-1 i TGF- β , wydaje się być najefektywniejszym kandydatem do testowania angiogenezy *in vitro* (Staton, Reed i Brown, 2009). W prezentowanej pracy WJ-EPC były zdolne do tworzenia sieci pseudo-kapilarnych już po 4 dniach różnicowania w kierunku śródbłonka. Stworzone sieci jednak cechowały się mniejszymi średnicami pętli i były mniej trwałe w porównaniu do struktur stworzonych przez WJ-EPC różnicowanych przez 7 dni. W przypadku tych drugich pierwsze oznaki

tworzenia sieci pseudo-naczyniowej zaobserwowano już po dwóch godzinach inkubacji na Matrigel. Największą liczbę pętli i połączeń można było zaobserwować po 7 godzinach od rozpoczęcia eksperymentu. W ósmej godzinie pseudo-tubule zaczynały się wydłużać, a następnie pękać, natomiast komórki grupowały się w agregaty. W większości badań wykorzystujących EC obserwowano stabilne i trwałe sieci nawet do 24 godzin od rozpoczęcia eksperymentu. W badaniach Portalska i wsp. (2012) sieci pseudo-naczyniowe były obserwowane nawet do 7 dni po wysianiu BM-MSC uprzednio różnicowanych w kierunku śródbłonna przez 10 dni. Z drugiej strony pierwsze oznaki tworzenia sieci obserwowano dopiero po 24 godzinach. W przypadku wysiania komórek nieróżnicowanych największe usieciwienie badacze odnotowali do 8 godziny od rozpoczęcia inkubacji na Matrigel, po czym sieć degradowała. Wyniki te różniły się od naszych doświadczeń, w których w odróżnieniu od WJ-EPC, komórki nieróżnicowane WJ-MSC w ogóle nie tworzyły pseudo-naczyniowych sieci, jedynie grupowały się w agregaty.

Według Waterman i wsp. (2010) MSC na wzór monocytów są zdolne do ukierunkowania do fenotypu immunosupresyjnego, w wyniku stymulacji receptora TLR3 lub zapalnego, na skutek aktywacji receptora TLR4, z czym wiążą się zmiany w profilu parakrynnym (Waterman i in., 2010). Regeneracyjne działanie MSC w dużej mierze przypisuje się szeregowi wydzielanych przez nie czynników, m.in. bFGF, VEGF, TGF- β , BDNF, PDGF, IL-6, HGF i innym (Liang i in., 2014). Wybranymi przez nas czynnikami były: przeciwzapalny, stymulujący migrację komórek i angiogeny TGF- β 1, immunomodulacyjna, antyapoptotyczna i angiogenna IL-6 oraz należący do angio-glio-neuryn VEGF wykazujący najszersze spektrum działania, w tym immunomodulacyjne, angiogenne, neurogenne, antyapoptotyczne i stymulujące migrację komórek (van Velthoven i in., 2013), (Botto i in., 2011), (Sun i in., 2003), (Yoo i in., 2013). Poza oceną poziomu sekrecji powyższych czynników, podjęliśmy również próbę stymulacji ich wydzielania *in vitro* poprzez aktywację receptorów TLR3/4 ich agonistami Poli(I:C) i LPS. W prezentowanych przez nas badaniach wykazaliśmy stabilną sekrecję wszystkich trzech czynników w obu typach niestymulowanych ligandami komórek. Potwierdziliśmy, że WJ-MSC niezależnie od zastosowanego stężenia LPS lub Poli(I:C) są całkowicie niewrażliwe na stymulację receptorów Toll-podobnych, co jest spójne z badaniami Raicevic i wsp. (2011) (Raicevic i in., 2011). Co ciekawe w przeciwieństwie do WJ-MSC komórki ukierunkowane śródbłonkowo WJ-EPC zwiększyły wydzielanie TGF- β 1 i IL-6 po zastosowaniu wyższych stężeń LPS i Poli(I:C). W przeciwieństwie do Mastri i wsp. (2014) nie odnotowaliśmy zwiększonej sekrecji czynnika VEGF w obu typach komórek w wyniku stymulacji receptorów TLR3/4 (Mastri, Lin i Lee, 2014). W licznych badaniach wykazywano potencjał MSC do zwiększania swoich właściwości wydzielniczych po zastosowaniu stymulacji receptorów TLR3 lub TLR4. W pracy Mastri i wsp. (2014) wykazano podwyższenie sekrecji IL-6, IL-10, IL-11, LIF, SDF-1, VEGF i HGF po 24 godzinnej inkubacji BM-MSC z Poli(I:C) (Mastri i in., 2012), przy czym po użyciu wyższego stężenia ligandu zaobserwowano aktywację wydzielania prozapalnych IL-1 β i TNF- α . W innych badaniach odnotowano zwiększone wydzielanie immunomodulacyjnej IL-6 oraz prozapalnych IL-4 i IL-8 po aktywacji receptora TLR4 oraz podwyższenie ekspresji IL-1ra hamującego prozapalne działanie IL-1 na skutek stymulacji TLR3 (Waterman i in., 2010). Różnice w aktywacji receptorów Toll-podobnych w poszczególnych pracach badawczych mogą być związane z różnicami pomiędzy MSC pochodzącymi z różnych źródeł. Gordana Raicevic razem ze swoim zespołem wykazała, że pochodzenie mezenchymalnych komórek macierzystych determinuje profil ekspresji receptorów Toll-podobnych. W pracy tej porównano potencjał do aktywacji TLR3/4 w MSC pochodzących z tkanki tłuszczowej, szpiku kostnego i galarety Whartona. Wykazano że

BM-MSC i ADSC odpowiadały na stymulację LPS i Poli(I:C) zwiększonymi właściwościami parakrynnymi, przy całkowitym braku reakcji ze strony WJ-MSC. Ponadto badacze wykazali, że w przeciwieństwie do BM-MSC i ADSC, WJ-MSC nie wykazują ekspresji TLR4, a ekspresja TLR3 jest na bardzo niskim poziomie. Jest to spójne z naszymi wynikami, w których również potwierdziliśmy śladowy poziom ekspresji TLR4 oraz nieznacznie większą ekspresję TLR3 w WJ-MSC i WJ-EPC w porównaniu do BM-MSC. Ponadto według Raicevic i wsp. (2011) receptor TLR3 na powierzchni WJ-MSC jest nieaktywny (niefunkcyjny?). Innym powodem, przez który WJ-MSC są niewrażliwe na stymulację receptorów Toll-podobnych może być najwyższa spośród badanej grupy komórek produkcja czynnika HGF, niezależnie od zastosowanych stymulantów prozapalnych (IL-1 β , TNF- α , IFN- α i IFN- γ), czy agonistów receptorów TLR3/4. Czynnikiem ten, obok znikomej ekspresji TLR4 i niefunkcyjnego TLR3, dodatkowo hamuje odpowiedź na stymulację ligandami (Raicevic i in., 2011). WJ-MSC jako komórki pochodzące z tkanek płodu wykazują mniejszą immunogenność niż MSC pochodzące z dorosłych tkanek, dlatego ich niewrażliwość na LPS czy Poli(I:C) można wiązać ze swego rodzaju „niedojrzałością”. Ponadto nikła reakcja na stymulację TLR4 może być również związana z brakiem ekspresji przez mezenchymalne komórki macierzyste CD14, niezbędnego do aktywacji tego receptora (Ullah, Subbarao i Rho, 2015). Ze względu na nieznaczną stymulację receptorów Toll-podobnych, a przez to niedostateczne podwyższenie sekrecji badanych czynników przez WJ-MSC oraz WJ-EPC, w dalszych badaniach nie kontynuowano aktywacji TLR3/4.

Nadrzędnym celem badań *ex vivo* i *in vivo* była ocena właściwości naczynio- i neuroprotektoryjnych ludzkich WJ-MSC oraz WJ-EPC. W naszych doświadczeniach z zastosowaniem modelu organotypowej hodowli skrawków hipokampa (OHC) szczura poddanej czasowemu pozbawieniu glukozy i tlenu (OGD) zaobserwowano istotny spadek gęstości naczyń krwionośnych w regionie CA1 hipokampa w porównaniu do nieuszkodzonych skrawków. Ponadto potwierdzając wcześniejsze badania (Ziemka-Nałęcz, Zalewska, Zajac i Domańska-Janik, 2003; Domańska-Janik, Bronisz-Kowalczyk, Zajac i Zabłocka, 2001) wykazano szczególną wrażliwość regionu CA1 na warunki pozbawienia glukozy i tlenu, wyrażającą się zwiększoną śmiertelnością komórek w porównaniu do kontrolnego regionu CA2/3. Wyniki te są spójne z doświadczeniami Chip i wsp. (2013), w których wykazano korelację pomiędzy śmiercią komórek a zmniejszeniem gęstości naczyń krwionośnych w regionie CA1 hipokampa na skutek OGD (Chip, Nitsch, Wellmann i Kapfhammer, 2013). Wciąż nie są znane mechanizmy wybiórczej wrażliwości poszczególnych regionów mózgu na niedokrwienie. Jako prawdopodobne powody wymienia się m.in. różnice w transporcie Ca²⁺, funkcjonowaniu mitochondriów, ekspresji receptorów glutaminianu, czy degradacji proteosomalnej w neuronach piramidowych regionu CA1 w porównaniu do innych regionów, np. CA3. Chip i wsp. (2013) sugerują związek między śmiercią neuronów, przepuszczalnością bariery krew-mózg, a nieprawidłowościami w transporcie glukozy w astrocytach objawiającymi się m.in. obniżoną ekspresją transportera glukozy (GLUT1), przy jednoczesnym zwiększeniu jego ekspresji w komórkach śródbłonna naczyń. Ponadto badacze wykazali istotny spadek ilości białka połączeń ścisłych kładyny 5 w regionie CA1 po OGD (Chip i in., 2013). W badaniach Ziemka-Nałęcz i wsp. (2003) w wyniku globalnego niedokrwienia mózgu u myszokoczka Mongolskiego zaobserwowano aktywację zależnej od Ca²⁺ proteazy cysteinowej kalpajny, skutkującej degradacją białek cytoszkieletu, utratą integralności strukturalnej i śmiercią neuronów w regionie CA1 hipokampa (Ziemka-Nałęcz i in., 2003). Według Zhu i wsp. (2012) na skutek niedokrwienia dochodzi do podwyższenia poziomu neuroprotektoryjnego białka szoku cieplnego Hsp70.1 zarówno w regionie CA1 jak i w neuronach korowych. Uważa się, że Hsp70.1

bierze udział w stabilizacji błon lizosomalnych i przez to inhibuje uwalnianie proteaz, w tym katepsyny. Ze względu na różnice w napływie jonów Ca^{2+} między neuronami regionu CA1 hipokampa a neuronami korowymi, w tym pierwszym dochodzi do aktywacji kalpajny. W neuronach kory ruchowej sugeruje się brak lub nieznaczny poziom tej proteazy. Hsp70.1 oddziałuje z czynnikiem transkrypcyjnym NF κ B p65 odpowiedzialnym za aktywację programowanej śmierci neuronów oraz wpływa na zwiększenie poziomu inhibitora tego czynnika I κ B α , co ostatecznie skutkuje neuroprotekcją neuronów korowych. W regionie CA1 w związku z aktywacją kalpajny dochodzi do cięcia Hsp70.1, przez co białko to staje się dysfunkcyjne, a NF κ B p65 jest aktywowane skutkując śmiercią neuronów (Zhu i in., 2012). Istnieje prawdopodobieństwo, że mechanizm ten wywołuje również degradację innych komórek jednostki neuronacyjnej.

W wyniku współhodowli oragnotypowych skrawków hipokampa czasowo pozbawionych glukozy i tlenu z WJ-MSc lub WJ-EPC zaobserwowaliśmy statystycznie istotne zmniejszenie śmiertelności komórek w regionie CA1 hipokampa po OGD. Efekt ten uzyskany w hodowli uniemożliwiającej bezpośredni kontakt skrawków hipokampa z WJ-MSc lub WJ-EPC, sugeruje parakryny mechanizm ich działania. Potwierdziło to wyniki badań Sarnowska i wsp. (2009), w których badacze po raz pierwszy zaobserwowali zwiększoną przeżywalność komórek w regionie CA1 hipokampa w wyniku współhodowli OHC z komórkami pochodzącymi z krwi pępowinowej (ang. Umbilical Cord Blood-derived Neural Stem/Progenitor Cells, HUCB-NSCs) (Sarnowska i in., 2009). Ponadto w prezentowanych badaniach *in vivo*, w których do uszkodzonego przez podanie inhibitora pompy Na^+/K^+ (ouabainy) prądkowia mózgu szczura przeszczepiliśmy WJ-MSc lub WJ-EPC osadzone na szkieletach z lisatu płytkowego, zaobserwowaliśmy istotne zmniejszenie uszkodzenia 7, 14 i 21 dni po transplantacji. Wynik ten był porównywalny dla obu typów komórek. Podobny efekt ochronny otrzymał w swoich badaniach Voulgari-Kokota, w których pierwotna hodowla neuronów korowych była inkubowana z mezenchymalnymi komórkami macierzystymi lub z pożywką zebraną z hodowli MSc, a następnie po 24 godzinach została poddana uszkodzeniu ekscytotoksycznemu. Jak wykazano, neurony inkubowane zarówno z komórkami jak i z samą pożywką wykazywały zmniejszoną ekspresję receptorów NMDA, co skutkowało zmniejszeniem wrażliwości na nadmierną akumulację kwasu glutaminowego i w konsekwencji na uszkodzenie ekscytotoksyczne. Wykazano również że, w wyniku inkubacji z tak kondycjonowaną pożywką zebraną z hodowli MSc dodatkowo dochodziło do hamowania indukowanego glutaminianem napływu jonów Ca^{2+} , co również wiązało się z efektem neuroprotekcijnym. Mogło to wpływać również na zmniejszenie aktywności wyżej opisywanej kalpajny (Voulgari-Kokota i in., 2012). W innych badaniach wykazano że mezenchymalne komórki macierzyste wykazują ekspresję klasycznych inhibitorów apoptozy: Bcl-2, surwiwiny i Akt. Bcl-2 jest heterogenną grupą białek odpowiedzialną za regulację uwalniania czynnika indukującego apoptozę (ang. apoptosis inducing factor, AIF) i cytochromu c z mitochondriów. Surwiwina jest inhibitorem apoptozy zależnej i niezależnej od kaspaz. Natomiast AKT jest głównym efektem PI3K (3-kinazy fosfatidyloinozytolu) i w wyniku aktywacji ścieżki sygnałowej PI3K/Akt dochodzi do stabilizacji funkcji mitochondriów, blokady sekrecji cytochromu c z mitochondriów, hamowania kaspazy-9 i -3 oraz do zahamowania cięcia DNA (Kilic i in., 2006). W badaniach z wykorzystaniem modelu MCAO po transplantacji progenitorów śródbłonna doszło do zmniejszenia uszkodzenia oraz poprawy neurobehawioralnej (Qiu i in., 2013). Wpływ EPC na zmniejszenie poniedokrwiennych deficytów może mieć związek zarówno z wydzielaniem przez te komórki czynników wzrostowych, jak również z odbudową naczyń krwionośnych, w tym okołonaczyniowych ścieżek migracyjnych, po których

nowopowstałe neurony wędrują do miejsca uszkodzenia. Co więcej, wykazano że podobnie jak MSC, progenitory śródbłonkowe działają antyapoptotycznie poprzez zwiększenie ekspresji Bcl-2 oraz obniżenie ekspresji kaspazy 3, Bax, NFκβ w ischemicznej tkance. W wyniku podania EPC wyizolowanych ze szpiku kostnego obserwuje się również istotne podwyższenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), glutationu (GSH) i peroksydazy glutationowej (GSH-PX) wpływające na zmniejszenie stresu oksydacyjnego (Li i in., 2015). Uważa się, że czynnikiem odgrywającym znaczącą rolę w neuroprotekcji jest wydzielany przez WJ-MSC i WJ-EPC VEGF. Stymuluje on ekspresję Bcl-2 w komórkach endotelialnych oraz aktywuje kinazę płytek przylegania (FAK), w wyniku czego dochodzi do hamowania apoptozy indukowanej ścieżką z udziałem białka p53 (Liang i in., 2014). Za sprawą VEGF w neuronach dochodzi do redukcji poziomu syntazy tlenu azotu (NOS), zaostrej uszkodzenie niedokrwienne poprzez produkcję toksycznych NO²⁻ i NO³⁻ (Kilic i in., 2006). W badaniach *in vitro* wykazano że VEGF istotnie podwyższa przeżywalność neuronów poddanych czasowemu pozbawieniu glukozy i tlenu lub uszkodzeniu excytotoksycznemu (Greenberg i Jin, 2013). Większość badań donosi również, że podanie domózgowe VEGF-A skutkuje zmniejszeniem obszaru niedokrwiennego. Co ciekawe w badaniach, w których VEGF-A podano donaczeniowo 1 godzinę po MCAO stwierdzono, że wielkość uszkodzenia uległa zwiększeniu, natomiast przy podaniu po 48 godzinach zaobserwowano odwrotną reakcję. Może się to wiązać z różnym oddziaływaniem tego czynnika w zależności od czasu jaki upłynął od pojawienia się uszkodzenia niedokrwiennego. W początkowej fazie VEGF bierze udział w zwiększeniu przepuszczalności bariery krew-mózg, natomiast w późniejszej jego działanie łączy się z oddziaływaniem neuro-/angio-regeneracyjnym (Zhang i in., 2000). Innymi czynnikami wydzielanymi zarówno przez EPC jak i MSC, które posiadają działanie cytoprotekcyjne są również IGF-1 i HGF. Wykazano ponadto, że czynniki te stymulują angiogenezę i rekrutację oraz proliferację endogennych progenitorów (Urbich i in., 2005). Innym mechanizmem proponowanego działania neuroprotekcijnego MSC jest działanie immunosupresyjne. Wykazuje się szereg czynników biorących udział w hamowaniu odpowiedzi immunologicznej przez MSC. W prezentowanej pracy wykazano, że zarówno WJ-MSC jak i WJ-EPC są zdolne do wydzielania immunomodulujących IL-6 i TGF-β1. Według Fairbairn i wsp. (2015) sekrecjonowany przez mezenchymalne komórki macierzyste TGF-β działa przeciwzapalnie przez hamowanie proliferacji limfocytów T CD4⁺ i CD8 (Di Nicola i in., 2002). W innych badaniach wykazuje się że w wyniku zwiększonej sekrecji IL-6 przez MSC dochodzi do zwiększenia liczby regulatorowych limfocytów T wydzielających przeciwzapalną IL-10 (Li i in., 2010). Uważa się również, że IL-6 inhibuje sekrecję licznych czynników zapalnych np.: IL-1, TNFα, GM-CSF, IFNγ (Kyurkchiev i in., 2014).

Ze względu na liczne doniesienia dotyczące niskiej przeżywalności przeszczepionych domózgowo komórek macierzystych/progenitorowych, w prezentowanej pracy WJ-MSC i WJ-EPC były transplantowane z lizatem płytkowym sieciowanym trombiną (Fairbairn i in., 2015). Lizat płytkowy poza sugerowanym przez nas działaniem ochronnym dla MSC, według Hayon i wsp. (2012 i 2013) stymuluje neuro- i angio-genezę, co może wzmocnić terapeutyczny efekt przeszczepu (Hayon i in., 2012a, 2013). W prezentowanych badaniach w strefie półcienia w prążkowie po transplatacji WJ-MSC/WJ-EPC osadzonych na lizatach płytkowych zaobserwowano zwiększenie liczby proliferujących komórek. Wyniki te są zgodne w obserwacjami van Velthoven i wsp. (2012) gdzie w wyniku transplatacji komórek mezenchymalnych wykazano znaczne zwiększenie liczby proliferujących komórek progenitorowych, które następnie różnicowały w kierunku neuronów,

astrocytów i oligodendrocytów (van Velthoven, Kavelaars i Heijnen, 2012; Felling i in., 2006). W innych badaniach w modelach zwierzęcych wykazano, że progenitory śródbłonkowe w wyniku niedokrwienia mózgu, są uwalniane ze szpiku i miejsc okołonaczyniowych, w pobliżu uszkodzenia, gdzie stymulują odbudowę naczyń krwionośnych strefy półcienia (Wei i in., 2001; Asahara i in., 1999; Sharma i in., 2012). Jest to zgodne z naszymi badaniami, w których w części mózgow po transplantacji WJ-EPC zaobserwowano pojedyncze komórki wyznakowane przeciwciałem skierowanym przeciwko szczurczemu śródbłnkowi (RECA-1). Sugeruje to stymulację migracji endogennych EPC do miejsca uszkodzenia przez przeszczepione WJ-EPC, co prawdopodobnie wzmacnia ich działanie angiogenne. Co interesujące, po transplantacji WJ-MSC nie zaobserwowano pojedynczych komórek RECA-1⁺, wskazując na mniejszy potencjał nieróżnicowanych śródbłnkowo komórek MSC do stymulacji migracji i proliferacji endogennych EPC. Ze względu na podobny poziom proliferacji po transplantacji WJ-MSC/WJ-EPC, pojedyncze komórki RECA-1⁺ mogą być wczesnymi, niedzielącymi się progenitorami śródbłnkowymi. Poza stymulacją komórek śródbłnka zaobserwowaliśmy również istotne zwiększenie liczby endogennych komórek wykazujących obecność markera dojrzałych neuronów NF200 po transplantacji WJ-MSC. Ponadto część WJ-MSC i WJ-EPC zareagowało pozytywnie z przeciwciałem skierowanym przeciwko wczesnemu markerowi neuralnemu – nestynie. W obu przypadkach reakcja była silniejsza dla nieróżnicowanych śródbłnkowo WJ-MSC, sugerując wyższy potencjał neurogeny tych komórek. Mimo to, nie zaobserwowano współwystępowania NF200 z markerem przeszczepionych komórek CD44, co prawdopodobnie wiąże się z parakrynnym mechanizmem ich działania lub/i ze stabilizacją uszkodzonej tkanki, a przez to stymulacją neurogenezy i migracji.

Jedną z ważniejszych ścieżek sygnałowych, wspólną dla EPC jak i MSC, biorącą udział w rekrutacji endogennych i egzogennych komórek do miejsca uszkodzenia jest oś SDF-1/CXCR4. W wyniku niedokrwienia SDF-1 jest wydzielany m.in. przez astrocyty, mikroglej i śródbłonek co za pośrednictwem ekspresjonowanego zarówno na powierzchni MSC jak i EPC receptora CXCR4 na zasadzie chemotaksji przyciąga egzogenne i endogenne komórki progenitorowe do miejsca uszkodzenia. MSC i EPC są również zdolne do wydzielania SDF-1, co dodatkowo wzmacnia migrację endogennych komórek progenitorowych (Li i in., 2015), (Yu i in., 2012). Co interesujące, EPC wyizolowane ze sznura pępowiny wykazują wyższą ekspresję CXCR4 w porównaniu do komórek wyizolowanych ze szpiku kostnego (Finney i in., 2006). W szczurzym modelu MCAO wykazano że transplantacja MSC nadekspresjonujących CXCR4 skutkuje podwyższonym potencjałem migracyjnym, neuroprotekcijnym oraz angiogenym tych komórek (Yu i in., 2012). Może to tłumaczyć inne badanie, w którym dowiedziono, że wysoka ekspresja tego receptora wpływa na zwiększone wydzielanie VEGF i pro-migracyjnej/angiogennej IL-6 (Yu i in., 2012, s. 4; Yang i in., 2015). Innym wspólnym dla MSC i EPC mechanizmem biorącym udział w zasiedlaniu uszkodzonej tkanki jest reakcja VLA-4 z VCAM-1 i ICAM-1. Ponadto oba typy komórek ekspresjonują receptor dla kwasu hialuronowego CD44, mogący oddziaływać również z kolagenem (De Becker i Riet, 2016; Li i in., 2015).

Ograniczenie tworzenia blizny glejowej w wyniku sekrecyjnego działania MSC może również odgrywać istotną rolę w odbudowie uszkodzonej tkanki. Tak jak wspomniano wcześniej, w wyniku uszkodzenia niedokrwienego OUN dochodzi do aktywacji i hipertrofii astrocytów, objawiającej się zwiększeniem ekspresji GFAP, które m.in. razem z mikroglejem tworzą bliznę glejową. Prowadzi to do gęstego upakowania zewnątrzkomórkowego kolagenu i utworzenia szczelnej bariery dla aksonów

oraz progenitorów neuralnych i endotelialnych i hamowania regeneracji neuronaczyniowej (Abeysinghe i in., 2016). W prezentowanych przez nas badaniach wykazaliśmy zahamowanie tworzenia blizny glejowej w wyniku transplantacji WJ-MSC oraz WJ-EPC, objawiające się istotnym obniżeniem liczby astrocytów GFAP+ oraz makrofagów/mikrogleju ED1⁺ w okolicy uszkodzenia niedokrwiennego w mózgu szczura. Przeciwwzpalny efekt przeszczepianych komórek wyrażony zmniejszeniem liczby komórek mikrogleju był porównywalny zarówno dla WJ-MSC i WJ-EPC. W przypadku astrocytów, WJ-MSC wykazywały istotnie wyższe działanie hamujące w porównaniu do WJ-EPC. Tym samym potwierdzamy wcześniejsze wyniki przedstawione przez McGuckin i wsp. (2013), w których w wyniku współhodowli OHC z MSC lub transplantacji MSC do post-niedokrwiennego prążkowania mózgu szczura doszło do redukcji aktywacji mikrogleju oraz astrocytów (McGuckin i in., 2013). Nasze wyniki są spójne z badaniami Voulgari-Kokota, w których w mysim modelu ekscytotoksycznego uszkodzenia kwasem kainowym, po transplantacji szpikowych mezenchymalnych komórek macierzystych, zaobserwowano zmniejszenie uszkodzenia neuronów i poziomu aktywacji komórek glejowych w hipokampie (Voulgari-Kokota i in., 2012). W badaniach Xue i wsp. (2015) wykazano zahamowanie tworzenia blizny glejowej w wyniku transplantacji do rdzenia kręgowego BM-MSC osadzonych na chitynowym szkielecie. Według badaczy wiązało się to z hamowaniem migracji astrocytów do rdzenia uszkodzenia i dzięki temu przyczyniło się do szybszej i efektywniejszej regeneracji tkanki nerwowej (Xue i in., 2015). W badaniach Veeravalli i wsp. (2009) zahamowanie tworzenia blizny glejowej w rdzeniu przedłużonym na skutek podania komórek macierzystych z krwi pępowinowej wiązało się ze zwiększeniem ekspresji metaloproteinazy 2 (Veeravalli i in., 2009). W innych badaniach Yan i wsp. (2013) wykazano, że w wyniku inkubacji zaktywowanego przez LPS mikrogleju z pożywką kondycjonowaną BM-MSC doszło do zmniejszenia jego proliferacji oraz sekrecji czynników prozapalnych, w tym TNF- α , IL-1 β , RANTES, CXCL-2 oraz podwyższenia wydzielania IL-10, IL-6 i VEGF (Yan i in., 2013). Natomiast w badaniach Giunti i wsp. (2012) wykazuje się, że MSC poprzez swoje właściwości parakryne zwiększają w komórkach mikrogleju ekspresję czynników związanych z ich neuroprotektoryjnym fenotypem, w tym CXCR1, receptorem dla CD200 i IGF-1 (Giunti i in., 2012). W kolejnych badaniach wykazano, że w wyniku zablokowania ekspresji NF κ B dochodzi do zmniejszenia odpowiedzi zapalnej oraz zahamowania astroglizy (Brambilla i in., 2005). Biorąc pod uwagę opisywaną powyżej zdolność MSC i EPC do obniżenia ekspresji opisywanego czynnika, można wnioskować, że jest to jeden z mechanizmów hamowania tworzenia blizny glejowej i odpowiedzi zapalnej. Ponadto w najnowszych badaniach wykazano, że wydzielany przez MSC TGF- β hamuje odpowiedź zapalną przez blokowanie ścieżki sygnałowej związanej z NF κ B i stymuluje przejście mikrogleju z fenotypu zapalnego w przeciwwzpalny (Noh i in., 2016).

Pozytywny wpływ WJ-MSC lub WJ-EPC na naczynia krwionośne potwierdzono zarówno w prowadzonych przez nas badaniach *ex vivo* jak i *in vivo*. W organotypowej hodowli skrawków hipokampa czasowo pozbawionej glukozy i tlenu wykazano istotnie wyższą gęstość naczyń krwionośnych w szczególnie wrażliwym regionie CA1 w wariantach ze współhodowlą WJ-MSC/WJ-EPC w porównaniu do tego samego regionu w OHC-OGD hodowanych bez komórek. Efekt ten był mocniej wyrażony we współhodowli z WJ-EPC niż WJ-MSC, jednak różnica ta nie była znamienna statystycznie. Podobne działanie uzyskaliśmy również w badaniach *in vivo*. W wyniku transplantacji obu typów komórek wykazaliśmy zwiększenie liczby naczyń krwionośnych, szczególnie w sąsiedztwie przeszczepu. W tym przypadku efekt ten był istotnie statystycznie silniejszy w wariantach

z zastosowaniem WJ-EPC, w porównaniu do WJ-MSC. W obu wariantach naczynia krwionośne były ściśle otoczone przeszczepionymi komórkami, tworzącymi wokół/razem z nimi wyraźne tubule. Jest to spójne z wynikami badań Allameh i wsp. (2016), w których po podskórnym wszczepieniu w okolice pachwin różnicowanych śródbłonkowo BM-MSC zaobserwowano tworzenie nowych naczyń krwionośnych. W innych badaniach Mirza i wsp. wykazali, że w wyniku przeszczepienia do aorty szczura poliuretanowej rurki z BM-MSC, dochodzi do wytworzenia typowych dla naczyń krwionośnych wielokomórkowych struktur (Mirza i in., 2008). Pomimo, że MSC otaczające naczynia krwionośne przypominały astrocyty, różniły się one lokalizacją w stosunku do komórek wykazujących obecność markera GFAP. Jedynie u pewnej części WJ-MSC można było zaobserwować współwystępowanie markera glejowego GFAP. Jest to spójne z wynikami badań Anbari i wsp. (2014), w których w modelu urazowego uszkodzenia mózgu po 14 dniach od donaczyniowego podania BM-MSC, zaobserwowano ekspresję GFAP w transplantowanych komórkach (Anbari i in., 2014). W prezentowanej pracy zlokalizowane wokół naczyń krwionośnych komórki mogły, z jednej strony uczestniczyć w regeneracji uszkodzonych naczyń krwionośnych zasiedlając je, a z drugiej strony mogły pełnić funkcję stabilizacyjną i parakrynną usprawniając endogenne procesy naprawcze. Wnioskujemy, że w wyniku 7-dniowego różnicowania WJ-MSC w kierunku śródbłonka otrzymaliśmy mieszaną populację wczesnych i późnych WJ-EPC, co mogło wpływać na ich właściwości angiogenne. Według Hur i wsp. (2004) wczesne EPC wydzielają szereg czynników angiogennych, takich jak VEGF, HGF, G-CSF i IL-8, dzięki którym dochodzi do rekrutacji endogennych komórek śródbłonka, indukcji ich proliferacji i zwiększenia ich przeżycia. Natomiast późne EPC dzięki intensywnej proliferacji dostarczają odpowiedniej liczby komórek w procesie angiogenezy (Hur i in., 2004). W badaniach Malinovskaya i wsp. (2016) wykazano również, że późne progenitory śródbłonkowe cechują się wyższą ekspresją receptora VEGFR-2 biorącego udział w różnych etapach angiogenezy i krytycznego dla proliferacji i migracji eNOS. Co ciekawe, wyższa ekspresja VEGFR2 przy niskiej ekspresji receptora dla angiopoetyny (Tie-2) promuje wbudowywanie się EPC do naczyń krwionośnych. Natomiast w odwrotnej konfiguracji dochodzi do stymulacji endotelializacji (Malinovskaya i in., 2016). Według Zacharek i wsp. (2007) BM-MSC stymulują angiogenezę oraz stabilizują naczynia krwionośne w mózgu po niedokrwieniu. W szczurzym modelu MCAO wykazano, że w wyniku transplantacji BM-MSC dochodzi do zmniejszenia przeuszczalności bariery krew-mózg i zwiększenia ekspresji Ang1, Tie2 i białka połączeń ścisłych okludyny. Co więcej, w dalszych badaniach wykazano że BM-MSC stymulują tworzenie sieci pseudo-naczyniowych przez szczurze komórki śródbłonkowe mózgu (MBECs) i ekspresję Ang1/Tie2 oraz VEGF/VEGFR2 zarówno przez MBECs jak i astrocyty (Zacharek i in., 2007). Opisywano również, że EPC w niedokrwiennej tkance biorą udział w regeneracji zdegenerowanych naczyń krwionośnych poprzez wydzielanie czynników wzrostowych, zastępowanie uszkodzonych komórek lub poprzez angiogenezę oraz tworzenie naczyń „*de novo*” czyli waskulogenezę (Liman i Endres, 2012). Szereg badań opisuje potencjał angiogeny zarówno MSC jak i EPC (Watt i in., 2013; Li i in., 2015). Z jednej strony mogą stabilizować strukturę naczyń, a z drugiej wydelać czynniki stymulujące proliferację, migrację i różnicowanie zarówno endogennych jak i egzogennie podanych komórek progenitorowych/macierzystych. Do czynników tych zalicza się m.in.: VEGF, PDGF, bFGF i TGF- β . W prowadzonych przez nas badaniach wykazaliśmy wydzielanie przez WJ-MSC oraz WJ-EPC zarówno VEGF jak i TGF- β 1. Większa gęstość naczyń krwionośnych w strefie półcienia po transplantacji WJ-EPC prawdopodobnie jest związana z wyższą ekspresją VEGF-A w porównaniu do WJ-MSC. Ponadto według części badań TGF- β 1 bierze również udział w różnicowaniu w kierunku mięśniówki gładkiej naczyń (Huang i Li, 2008).

W prezentowanej pracy dowodzimy, że zarówno WJ-MSK jak i WJ-EPC wykazują wszechstronne działanie regeneracyjne na uszkodzoną w wyniku niedokrwienia jednostkę neuronocyniową obejmujące oddziaływanie z komórkami całej NVU w tym śródbłonna, astrocytów, neuronów czy komórek związanych z układem odpornościowym.

7. Podsumowanie wyników i wnioski

Wyniki prezentowanej pracy jednoznacznie wskazują na istotny potencjał WJ-MSC do różnicowania w kierunku progenitorów śródbłonka *in vitro*. Zarówno WJ-MSC, jak i WJ-EPC wydzielają czynniki odgrywające istotną rolę w regeneracji uszkodzonej jednostki neuronaczyniowej, w tym TGF- β 1, IL-6 i VEGF. W przypadku WJ-EPC sekrecja TGF- β 1 i IL-6 może być nieznacznie podwyższona w warunkach zapalnych dzięki stymulacji receptorów Toll-podobnych. Wykazano, że WJ-MSC jako komórki pochodzenia płodowego charakteryzujące się niepełną dojrzałością immunologiczną są właściwie niewrażliwe na stymulację receptorów TLR3/4 związanych z nabytą immunologiczną odpowiedzią adaptacyjną. Wykazano, że geny receptorów Toll-podobnych wykazują minimalną aktywność transkrypcyjną w komórkach mezenchymalnych pochodzących ze sznura pępowiny płodu w porównaniu z ekspresją tych genów w „dojrzałych” BM-MSC szpiku kostnego.

Oba typy komórek pochodzących z galarety Whartona, w wyniku współhodowli z organotypowymi skrawkami hipokampa szczura czasowo pozbawionymi glukozy i tlenu lub po transplantacji do uszkodzonego niedokrwieniem prążkowiego mózgu szczura, wykazywały zróżnicowane, aczkolwiek wyraźne efekty regeneracyjne. Po współhodowli lub transplantacji domózgowej zarówno WJ-MSC jak i WJ-EPC zaobserwowano niższą śmiertelność komórek rejonu CA1 hipokampa oraz zmniejszenie wielkości ogniskowego uszkodzenia mózgu szczura. Przeszczep komórkowy *in vivo* był wykonywany w specjalnej „osłonie”, którą tworzyły opracowane w naszym laboratorium rusztowania sieciujące *in situ* w tkance biorcy. Wyraźny efekt regeneracyjny przeszczepianych komórek był również związany z ich zmniejszoną immunogennością oraz zahamowaniem poniedokrwiennej aktywacji mikrogleju i astrocytów po transplantacji obu typów komórek, co skutkowało również zmniejszeniem tworzenia blizny glejowej. Zaobserwowana stymulacja migracji i proliferacji neuronalnych komórek progenitorowych, przy braku przeszkody jaką jest blizna, wzmacniała regeneracyjny wpływ WJ-MSC/WJ-EPC. Ponadto, we współhodowli OHC-OGD z obydwoma typami ludzkich komórek mezenchymalnych oraz po ich transplantacji do uszkodzonego niedokrwieniem prążkowiego mózgu szczura zaobserwowano zwiększoną liczbę naczyń krwionośnych w tkance gospodarza. Poza wpływem parakrynnym angiogennych czynników VEGF i TGF- β 1 wykazano, że WJ-MSC i WJ-EPC otaczają ściśle naczynia krwionośne pełniąc rolę stabilizującą lub/i zastępującą uszkodzone komórki endotelialne. W efekcie oba typy komórek mezenchymalnych pochodzących z tkanki płodowej galarety Whartona sznura pępowiny, dzięki swojej niskiej immunogenności przeżywały do 3 tygodni po obcogatunkowym przeszczepie domózgowym i stymulowały regenerację uszkodzonej niedokrwieniem tkanki gospodarza bez stosowania immunosupresji.

Podsumowanie wyników i najważniejsze wnioski:

Etap *in vitro*:

1. WJ-MSC posiadają silny potencjał do różnicowania w kierunku progenitorów śródbłonka.
 - W wyniku 7-dniowego różnicowania otrzymano mieszaną frakcję wrzecionowatych, wczesnych i sześciennych, późnych EPC.
 - WJ-EPC 3-krotnie zmniejszyły swoją wielkość oraz 5-krotnie zwiększyły tempo proliferacji.

- Zarówno WJ-MSc jak i WJ-EPC ekspresjonowały CD73, CD90, CD105, VEGFR2, VEGF-A, jednak tylko komórki różnicowane w kierunku śródbłonna charakteryzowały się obecnością specyficznych markerów śródbłonkowych vWF i PECAM-1.

- WJ-EPC wykazywały typowe cechy śródbłonkowe: zdolność do tworzenia struktur-pseudonaczyniowych oraz wychwyty LDL.

2. WJ-MSc i WJ-EPC wydzielają neuro-/naczynio-protেকcyjny i angiogeny VEGF, angiogeny i przeciwzapalny TGF- β 1 oraz immunomodulującą IL-6.

- WJ-EPC odpowiada na stymulację wyższymi stężeniami agonistów receptorów Toll-podobnych LPS i Poli(I:C) zwiększoną sekrecją TGF- β 1 i IL-6.

- WJ-MSc były niewrażliwe na stymulację receptorów TLR3/4, co prawdopodobnie było związane z ich niepełną dojrzałością immunologiczną, jako komórek popłodu.

- Oba typy komórek wykazywały znikomą ekspresję TLR3 i TLR4 w porównaniu do BM-MSc, co prawdopodobnie jest powodem nieznacznej w przypadku WJ-EPC oraz zerowej w przypadku WJ-MSc odpowiedzi na stymulację tych receptorów.

Etap *ex vivo*:

1. WJ-MSc i WJ-EPC wykazują właściwości neuroprotেকcyjne.

- W organotypowych skrawkach hipokampa szczura poddanych czasowo deprywacji glukozy i tlenu, w regionie CA1 doszło do zwiększenia liczby martwych komórek oraz atrofii naczyń krwionośnych.

- Współhodowla pośrednia OHC-OGD z WJ-MSc lub WJ-EPC wpłynęła na zwiększenie gęstości naczyń krwionośnych oraz zwiększenie przeżywalności komórek w szczególnie wrażliwym regionie CA1 hipokampa.

Etap *in vivo*:

1. WJ-MSc oraz WJ-EPC wykazują szerokie spektrum działania neuro-naczynio-regeneracyjnego.

- W wyniku transplantacji obu typów komórek na rusztowaniach z lizatu płytkowego doszło do istotnego zmniejszenia wielkości uszkodzenia w ogniskowo uszkodzonym mózgu szczura we wszystkich mierzonych punktach czasowych (7, 14 i 21 dni).

- WJ-MSc wykazywały wyższy potencjał do hamowania tworzenia blizny glejowej, natomiast WJ-EPC wywierały większy efekt angiogeny na uszkodzoną niedokrwienie tkankę.

- Oba typy komórek po transplantacji do uszkodzonego niedokrwieniem prążkowiec otaczały naczynia krwionośne, co wiązało się prawdopodobnie ze stabilizacją ich struktury ułatwiającą regenerację komórek śródbłonna.

- Wysoki potencjał WJ-EPC do odnowy naczyń krwionośnych wynikał prawdopodobnie ze zwiększonego wydzielania przez nie VEGF-A, potencjału do tworzenia struktur naczyniopodobnych i zastępowania przez nie uszkodzonych niedokrwieniem komórek śródbłonna.

Wnioski wypływające z prezentowanych badań wskazują na szczególną przydatność zastosowania WJ-MSC oraz WJ-EPC w regeneracji uszkodzonej niedokrwieniem jednostki neuronaczyniowej w mózgu. Co również istotne, w związku z niską immunogennością tych komórek izolowanych z niedojrzałych tkanek okołoporodowych, są one dobrze tolerowane przez układ immunologiczny biorcy, umożliwiając ich stosowanie w przeszczepach nieautologicznych szczególnie polecanych w leczeniu chorób uwarunkowanych genetycznie.

Udar mózgu jest drugim głównym powodem śmierci na świecie i najczęstszą przyczyną niesprawności w populacji osób w średnim i podeszłym wieku (Kanyal, 2015). W 85% spowodowany jest zatrzymaniem dopływu krwi do mózgu (udar niedokrwienny), natomiast w 15% uszkodzeniem naczyń i wylewem krwi do otaczającej tkanki (udar krwotoczny) (Stoll, Kleinschnitz i Nieswandt, 2008; Sliem, 2014; Chang i in., 2013). W wyniku niedokrwiennego uszkodzenia mózgu dochodzi do gwałtownego zaburzenia homeostazy tkanki, skutkującego nieprawidłowościami w przekaźnictwie sygnałów w obrębie postulowanej obecnie jednostki neuronaczyniowej (ang. Neuro Vascular Unit, NVU) (del Zoppo, 2009). Całokształt patologicznych reakcji zachodzących podczas niedokrwienia mózgu jest określany mianem triady naczyniowo-neuro-zapalnej. Składa się na nią: miejscowe ograniczenie przepływu krwi, rozszczelnienie bariery krew mózg, infiltracja komórek i sekrecja cytokin prozapalnych w obrębie i okolicy martwiczonego ogniska udarowego z aktywacją astrocytów i mikrogleju oraz śmiercią neuronów (del Zoppo, Moskowitz i Nedergaard, 2016; del Zoppo, 2010).

Obecnie w terapii udaru niedokrwiennego mózgu złotym standardem jest leczenie trombolityczne z zastosowaniem rekombinowanego tkankowego aktywatora plazminogenu (rt-PA, atepłaza). We wtórnej profilaktyce stosuje się leczenie przeciwplatekcyjne kwasem acetylosalicylowym. Niestety aby pacjent kwalifikował się do leczenia rt-PA musi spełniać restrykcyjne kryteria włączenia oraz zmieścić się w dość wąskim oknie terapeutycznym, wynoszącym 4,5 godziny od wystąpienia pierwszych objawów. Niezależnie od zastosowanego leczenia pacjenci przeważnie odczuwają skutki przebytego udaru i wymagają długotrwałej rehabilitacji. Ze względu na złożony mechanizm uszkodzenia ischemicznego, istnieje silna potrzeba znalezienia terapii o szerokim spektrum działania. Pomimo licznych badań, wciąż nie znaleziono leku o wystarczającej efektywności terapeutycznej. Dużym wyzwaniem jest również regeneracja uszkodzonego mózgu, szczególnie u pacjentów z utrwalonym deficytem neurologicznym.

Wszechstronne właściwości komórek mezenchymalnych czynią je doskonałym kandydatem do zastosowania w nowoczesnej medycynie regeneracyjnej. Komórki te są łatwe w pozyskaniu, bezpieczne oraz nie budzą kontrowersji etycznych. Jednymi z najistotniejszych cech mezenchymalnych komórek macierzystych w aspekcie odbudowy mózgu po niedokrwieniu są m. in.: potencjał do różnicowania w inne typy komórek, zarówno wywodzących się z mezodermy jak i neuroektodermy i zdolność do wydzielania licznych cytokin, w tym immunomodulujących, antyapoptotycznych, angiogennych i neurogennych. Ponadto komórki mezenchymalne są prawdopodobnie zdolne do formowania połączeń między niszami neurogennymi a miejscem uszkodzenia mózgu, przyczyniając się w ten sposób do stymulacji regeneracji. Niestety prowadzone do tej pory badania kliniczne wykazały umiarkowane i stosunkowo niespójne korzyści wynikające z terapii komórkowej, wskazując na konieczność zwiększenia efektywności terapeutycznej komórek (Tyndall, 2011; Prasad i in., 2014).

W zależności od zamierzonych celów właściwości regeneracyjne komórek można zwiększać na różnorodne sposoby. W prezentowanej pracy wykorzystano zdolność komórek mezenchymalnych do przechodzenia w stan immunomodulacyjny (fenotyp MS2) lub prozapalny (fenotyp MS1) poprzez stymulację odpowiednich receptorów Toll podobnych oraz potencjał do różnicowania w kierunku

progenitorów endotelialnych, które prawdopodobnie odgrywają istotną rolę w regeneracji uszkodzonego mózgu (Aguilera i in., 2014; Obtulowicz i in., 2016).

W prezentowanej pracy badano właściwości komórek mezenchymalnych pochodzących z galarety Whartona (WJ-MSC) oraz ich zdolność do indukowanego różnicowania się w kierunku progenitorów endotelialnych WJ-EPC. Komórki MSC pozyskuje się w łatwy i nieinwazyjny sposób ze sznura pępowiny, pobranego bezpośrednio po porodzie. Poza typowymi dla komórek mezenchymalnych właściwościami, WJ-MSC cechują się szybszą proliferacją, niską immunogennością oraz pro-neuralnym charakterem sekrecji i różnicowania (Drela i in., 2016; Kalaszczynska i Ferdyn, 2015). Co więcej w badaniach Jui-Yu Hsieh (2013) i w naszej grupie (Drela i in., 2016) wykazano, że w porównaniu do komórek pochodzących ze szpiku kostnego, komórki wyizolowane z galarety Whartona wydzielają więcej czynników związanych z działaniem neuroprotektynnym, neuro- i angiogennym oraz, dzięki swoim właściwościom parakrynnym, intensywniej stymulują różnicowanie i migrację endogennych komórek neuralnych. WJ-MSC wybiórczo stymulują wzrost neuronów i wykazują działanie antyapoptotyczne w pierwotnej hodowli komórek korowych w modelu czasowego pozbawienia glukozy i tlenu (ang. oxygen glucose deprivation, OGD). Komórki te również efektywniej indukują formowanie drobnych naczyń krwionośnych oraz migrację komórek we współhodowli z komórkami endotelialnymi (Hsieh i in., 2013).

W trakcie udaru niedokrwiennego, poza komórkami nerwowymi zostają uszkodzone również komórki endotelialne naczyń krwionośnych. Ostatnie badania donoszą, że MSC pochodzące z galarety Whartona mają zdolność do różnicowania się *in vitro* m. in. w progenitory endotelialne (WJ-EPC), które mogą odgrywać zasadniczą rolę w regeneracji uszkodzonych mikronaczyń i przywróceniu prawidłowego funkcjonowania jednostki neuronaczyniowej po podaniu domózgowym w udarze niedokrwiennym (Clifford, Deacon i Knox, 2008). W szeregu badań wykazano, że progenitorowe komórki endotelialne stymulują neowaskularyzację penumbry (Wei i in., 2001; Asahara i in., 1999; Sharma i in., 2012), a ich duża liczba w krwi obwodowej koreluje z pozytywnym przebiegiem klinicznym [26], [27]. Ponadto komórki endotelialne cechują się wysoką sekrecją szeregu czynników wzrostowych i cytokin stymulujących proliferację, migrację i tworzenie struktur kapilaropodobnych (Di Santo i in., 2014), takich jak: VEGF-A, B (Greenberg i Jin, 2013), TGF- β 1 (Dobolyi, Vincze, Pál i Lovas, 2012; Clifford, Deacon i Knox, 2008), IL-6 (Lahiani i in., 2015; Perígoło-Vicente i in., 2014), czy IL-10 (Segev-Amzaleg, Trudler i Frenkel, 2013; Levin i Godukhin, 2011; Sharma i in., 2011). W innych badaniach wykazano, że wzbogacenie hodowli komórek endotelialnych (HUVEC) uszkodzonych przez stres oksydacyjny (H_2O_2), pożywką zebraną z hodowli progenitorów endotelialnych, ma działanie antyapoptotyczne i chroni ją przed utratą właściwości naczyniotwórczych (Yang i in., 2010b). Poza właściwościami angiogennymi coraz częściej wskazuje się na właściwości neurogenne i neuroprotektynne progenitorów endotelialnych, co podkreśla istotność współdziałania tych elementów w ramach jednostki NVU (Park, Park, Liu i Baker, 2014b).

Wszystkie te dane zainspirowały badania, które stały się przedmiotem prezentowanej rozprawy doktorskiej. Postawiono pytanie czy komórki o profilu mezenchymalnym wyizolowane z galarety Whartona (WJ-MSC) mogą *in vitro* wytworzyć fenotyp o cechach klasycznych progenitorów endotelialnych (WJ-EPC) o zwiększonych/rozszerzonych właściwościach protekcyjnych w stosunku do zmian poniedokrwiennych mózgu.

Istotnym problemem związanym z terapią komórkową jest stosunkowo krótka przeżywalność nawet autologicznego przeszczepu w organizmie biorcy. Celem mojej pracy było również zbadanie czy istnieje możliwość przedłużenia żywotności i funkcji regeneracyjnej transplantu domózgowego komórek, między innymi poprzez optymalizację czasu wykonania przeszczepu, zahamowanie lub modyfikację odpowiedzi immunologicznej czy epi/genetycznej przeszczepianych komórek terapeutycznych. Obecnie jedną z najbardziej obiecujących metod wydłużania żywotności komórek jest przeszczepianie ich pod postacią agregatu 3D (Ritfeld i Oudega, 2014). Idealne rusztowanie, poza ochronnym i cytomimetycznym wpływem na przeszczepiane komórki, powinno wywoływać również pozytywne efekty regeneracyjne w otaczającej tkance biorcy. Biorąc pod uwagę dane literaturowe i poprzednie wyniki doświadczeń prowadzonych przez naszą grupę, wymogi te mógłby spełniać lizat płytkowy. W poprzednich badaniach przeprowadzonych przez Yael Hayon (2012 i 2013), wykazano że lizat płytkowy podany do komór bocznych mózgu po trwałej okluzji tętnicy środkowej mózgu szczura, działa neuro- i angio-genie zarówno w strefie okołokomorowej jak i bezpośrednio w miejscu uszkodzenia (Hayon i in., 2013, 2012a). Ponadto stwierdzono poprawę funkcji motorycznych po padaniu lizatu, a wielkość uszkodzenia ulegała zmniejszeniu sugerując całościowe działanie neuroprotektoryjne. W innej pracy tej samej grupy wykazano pozytywny wpływ lizatu płytkowego na proliferację, przeżywalność i różnicowanie neuralnych komórek macierzystych (Hayon i in., 2012b). Co najistotniejsze lizat ten w obecności trombiny wytwarza trójwymiarową sieć (Fortunato i in., 2016), która może służyć za rusztowanie (scaffold) dla podawanych domózgowo komórek regeneracyjnych.

Poza powyżej opisanymi głównymi celami, w prezentowanej pracy możemy wyróżnić cele pośrednie dotyczące :

- oceny potencjału hodowli komórek mezenchymalnych pochodzących z galarety Whartona (WJ-MSC) do indukowanego różnicowania się w kierunku endotelialnym (WJ-EPC);

- porównania wpływu WJ-MSC i WJ-EPC na powstawanie sieci naczyniowej oraz żywotność neuronów CA1 (wyjątkowo wrażliwych na ischemię) w organotypowym modelu hodowli skrawków hipokampa (OHC) po czasowym pozbawieniu glukozy i tlenu (OGD);

- oceny ekspresji immunomodulujących receptorów Toll-podobnych (TLR3 i TLR4) w warunkach kontrolnych i po stymulacji czynnikami immunomodulującymi oraz ich wpływu na sekretom komórek WJ-MSC i WJ-EPC;

- charakterystyki porównawczej oddziaływania WJ-MSC i WJ-EPC na sieć naczyniową, odpowiedź zapalną i tworzenie blizny gлевой w warunkach ich transplantacji domózgowej w eksperymentalnym modelu ischemicznego uszkodzenia mózgu szczura.

Badania zostały omówione w trzech podrozdziałach, zgodnie z ich przeprowadzeniem w warunkach 1) *in vitro*, 2) *ex vivo* i 3) *in vivo*.

1) W pierwszym etapie doświadczeń oceniono zdolność komórek WJ-MSC do różnicowania w kierunku endotelialnym w warunkach hodowli prowadzonej w obniżonym 5% stężeniu tlenu. Charakterystykę fenotypową komórek przeprowadzono poprzez oznaczenie ekspresji specyficznych markerów komórkowych, takich jak: vWF, PECAM-1, VEGFR2, VEGF, VCAM-1, CD90, CD73, CD105

metodami immunocytochemii, cytometrii przepływowej oraz biologii molekularnej. Potencjał proliferacyjny WJ-MSC i WJ-EPC oceniano przy pomocy kolorymetrycznych pomiarów z użyciem odczynnika WST-1. Funkcjonalne potwierdzenie endotelialnego kierunku różnicowania oceniono w hodowli prowadzonej na podłożu zawierającym białka macierzy zewnątrzkomórkowej (Extracellular Matrix, ECM) w obecności acetylowanej lipoproteiny o niskiej gęstości (DiI-Ac-LDL). Ocenę sekrecji wybranych cytokin i czynników wzrostowych: IL-1B, IL-6, TGF β -1 i VEGF, wykonano cytometrycznie przy użyciu zestawu CBA Flex Sets.

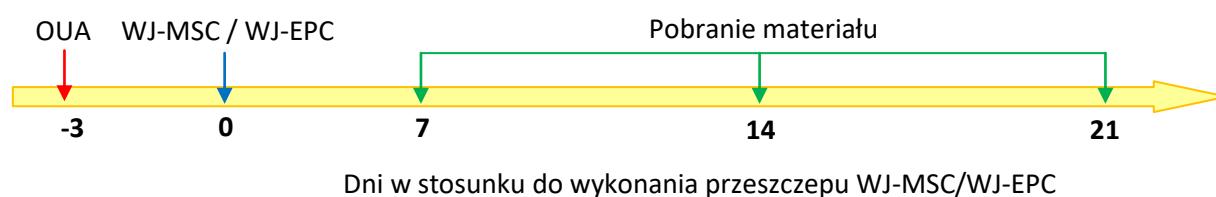
Komórki macierzyste wyizolowane z galarety Whartona w trakcie hodowli *in vitro* przyjmowały kształt podobny do fibroblastów, przylegały do podłoża oraz były zdolne do migracji. Charakterystyka fenotypowa tej frakcji wykazała typowe cechy komórek MSC. Otrzymane WJ-MSC posiadały silny potencjał do różnicowania w kierunku endotelialnym w warunkach obniżonego do 5% stężenia tlenu *in vitro* i zastosowaniu medium różnicującego EGM-2 (Lonza). Różnicowanie endotelialne znacząco zwiększyło potencjał proliferacyjny komórek mezenchymalnych. Średni czas podwajania populacji WJ-EPC (0,79 dnia) był cztery razy krótszy w porównaniu do WJ-MSC hodowanych równolegle (4,06 dnia). Komórki stawały się owalne oraz trzykrotnie zmniejszały swoją wielkość w porównaniu do wyjściowych komórek o klasycznym fenotypie MSC. Zarówno WJ-MSC, jak i WJ-EPC reagowały z przeciwciałami dla VEGF-A, VEGFR- 2 oraz VCAM-1, ale tylko zróżnicowane endotelialnie komórki wykazywały ekspresję specyficznych markerów PECAM-1 oraz vWF. Niezależnie od stopnia zróżnicowania oba typy komórek były immunopoztywne w reakcji z przeciwciałami dla markerów mezenchymalnych CD90, CD73 i CD105 oraz negatywne dla CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR. Komórki mezenchymalne pochodzące z galarety Whartona nabywały zdolności do tworzenia typowych dla endotelium struktur (pętli) kapilaropodobnych już po 4 dniach inkubacji w medium indukującym (EGM-2), jednak tworzone sieci zwiększały wydatnie swoją trwałość oraz średnice pętli aż do 7 dnia różnicowania. Czas wytwarzania pierwszych sieci kapilaropodobnych po wysianiu komórek EPC na Matrigel wynosił 2 godziny, natomiast największą liczbę pętli i połączeń między nimi można było zaobserwować po 7 godzinach hodowli. Funkcjonalnie, WJ-EPC wychwytywały DiI-AC-LDL już po 4 godzinach inkubacji, co jest jedną ze specyficznych cech fagocytujących makrofagów i komórek endotelialnych.

W celu poznania mechanizmów neuro- i naczynio-protekcyjnych badanych komórek mezenchymalnych sprawdzono w nich poziom sekrecji następujących czynników: przeciwzapalnego TGF-B1, immunomodulacyjnej IL-6 oraz naczynio-neuroprotekcyjnego VEGF. Stwierdzono znamienne wyższą sekrecję czynników TGF-B1, IL-6 i IL-1B przez komórki zróżnicowane do fenotypu EPC oraz brak wykrywalnych ilości wydzielanych interleukin IL-2 i IL-10 przez oba badane typy komórek. Sekrecja VEGF utrzymywała się na stabilnym, stosunkowo wysokim i porównywalnym poziomie zarówno w WJ-MSC jak i WJ-EPC. Stosując polecane w literaturze stężenia agonistów receptorów TLR3 i TLR4 (Poly(I:C) i LPS), zbadano ich wpływ na sekrecję badanych czynników przez oba typy komórek. W hodowli WJ-EPC zaobserwowano stymulację wydzielania TGF-B1 oraz IL-6 pod wpływem poliI i LPS (ligandów TLR3/4) przy spadku sekrecji VEGF w wyższych stężeniach tych agonistów. W równoległym doświadczeniu określono poziom ekspresji badanych czynników immunomodulujących i receptorów TLR w hodowli WJ-EPC i WJ-MSC. Oba typy komórek wykazywały stosunkowo niski poziom ekspresji zarówno receptorów Toll-podobnych TLR3 i TLR4 jak i czynników oraz cytokin sekrecyjnych TGF-B1, VEGF i IL-6, w porównaniu do BM-MSC, co można tłumaczyć niepełną dojrzałością układu immunologicznego komórek WJ o pochodzeniu płodowym.

2) Badania naczynio- i neuroprotekcynowego działania badanych komórek mezenchymalnych przeprowadzono w modelu niedokrwienia *ex vivo*, wywołanym czasowym pozbawieniem organotypowych skrawków hipokampa szczura (OHC) glukozy i tlenu (OGD). Stwierdzono wybiórcze uszkodzenie neuronów piramidowych w regionie CA1, przy zachowaniu niezmienniej struktury w regionie CA2/3. Wpływ WJ-MSC i WJ-EPC współhodowanych ze skrawkami hipokampa oceniano odpowiednio metodą barwienia immunocytochemicznego z zastosowaniem specyficznego dla endotelium szczura przeciwciała RECA-1 oraz poprzez przyżyciowe barwienie histochemiczne martwych komórek jodkiem propidyny (IP).

Klasyczna struktura naczyń krwionośnych szczura, oceniana na podstawie znakowania komórek endotelialnych przeciwciałem RECA-1 w organotypowych skrawkach hipokampa w regionach CA1 i CA2/3, była prawidłowa i dobrze zachowana przez cały czas trwania eksperymentu. Natomiast w wyniku uszkodzenia OGD obserwowano istotny i wybiórczy zanik naczyń krwionośnych w regionie CA1. W rejonie CA2/3 gęstość naczyń krwionośnych utrzymywała się na stabilnym poziomie. Nie zaobserwowano istotnego wpływu współhodowli nieuszkodzonych skrawków hipokampa z komórkami WJ-EPC/WJ-MSC w badanych regionach CA1 i CA2/3 w czasie trwania tego eksperymentu. Natomiast pośrednia współhodowla zarówno WJ-MSC jak i WJ-EPC z uszkodzonymi przez OGD skrawkami OHC znacząco hamowała atrofię naczyń krwionośnych w regionie CA1 hipokampa. Nieznacznie lepsze, acz nieistotne statystycznie właściwości naczynioprotekcyjne wykazywały komórki WJ-EPC (odpowiednio 1,5 i 1,4-razy większa gęstość naczyń krwionośnych w regionie CA1 we współhodowli z WJ-EPC i WJ-MSC). Śmierć komórek w organotypowych skrawkach hipokampa oceniana przyrostem liczby martwych komórek znakowanych jodkiem propidyny po poddaniu ich procedurze pozbawienia glukozy i tlenu (OGD), występowała selektywnie w regionie CA1. W wyniku współhodowli uszkodzonych skrawków zarówno z WJ-MSC jak i WJ-EPC, znacząco zmniejszyła się śmiertelność komórek tego regionu. Przyjmując umownie, że śmiertelność w CA1 po OGD wynosiła 100%, we współhodowli z komórkami WJ-MSC i WJ-EPC spadła ona do kolejno 76,7% oraz 70%.

3) Badania naczynio- i neuroprotekcynowej funkcji przeszczepu komórek WJ MSC i WJ EPC *in vivo* przeprowadzono na dorosłych (3 miesięcznych) szczurach szczepu Wistar (samce), według poniższego schematu (Ryc. 34):



Ryc. 34. Schemat przeprowadzanych doświadczeń *in vivo* (OUA- uszkodzenie mózgu szczura ouabainą; WJ-MSC/WJ-EPC – przeszczep komórek).

Jednostronne ogniskowe uszkodzenie mózgu (OUA) wykonano poprzez podanie ouabainy do okolicy prążkowiego mózgu szczura wg metody stosowanej od lat w naszej pracowni (Janowski i in., 2008). Efekty protekcyjne miejscowego przeszczepu WJ-MSC i WJ-EPC oceniano w tym modelu w okolicy lezji korowo/prążkowiej mózgu. Komórki terapeutyczne osadzano na szkieletach z usieciowanego

in situ lizatu płytkowego. Wielkość uszkodzenia mózgowia i komórkową reakcję zapalną szacowano po 7, 14 i 21 dniach od transplantacji. Do oceny wpływu egzogennych komórek na badane parametry reakcji poniedokrwiennego mózgu wykonano szereg barwień immunohistochemicznych z przeciwciałami skierowanymi przeciwko komórkom gospodarza (szczura): makrofagom (ED1), endotelialnym (RECA-1) i komórkom glejowym (GFAP).

Transplantacja ludzkich WJ-MSC i W-EPC do uszkodzonego prążkowania mózgu szczura skutkowała istotnym zmniejszeniem wielkości uszkodzenia we wszystkich wariantach czasowych w porównaniu do zwierząt, którym podano jedynie lizat płytkowy. W 14 dniu obserwowano maksymalną odpowiedź układu immunologicznego ze strony tkanki. Na podstawie analizy immunohistochemicznej stwierdzono w uszkodzonej tkance wyraźnie zmniejszoną ekspresję markera odpowiedzi zapalnej ED1 i markera glejowego GFAP oraz zwiększoną liczbę naczyń krwionośnych (RECA-1 pozytywnych) w okolicy uszkodzenia po transplantacji obu typów komórek mezenchymalnych usieciowanych w badanych szkieletach. Ponadto zaobserwowano zwiększony efekt naczynioprotekcyjny po transplantacji WJ-EPC w porównaniu do komórek WJ-MSC. Z drugiej strony te ostatnie wykazywały silniejsze działanie przeciwzapalne (zmniejszenie nacieku ED1), jak i hamujące w stosunku do wytwarzania się blizny glejowej ze znamienym spadkiem liczby komórek GFAP pozytywnych.

Wyniki moich badań wskazują na zdolność WJ-MSC do różnicowania się w kierunku endotelialnym (WJ-EPC) *in vitro* zarówno pod wpływem środowiska indukującego EGM-2 jak i w warunkach obniżonego stężenia tlenu w hodowli. Oba badane typy komórek są zdolne do wydzielania czynników mogących odgrywać rolę w naczynio- i neuroprotekcji uszkodzonej tkanki nerwowej. Natomiast, w przeciwieństwie do komórek MSC pochodzących z dorosłych tkanek, dodatkowa ich stymulacja agonistami receptorów Toll-podobnych (Poli I:C i LPS) skutkuje jedynie nieznacznym zwiększeniem sekrecji TGF- β 1, IL-6 o możliwym działaniu przeciwzapalnym. Może to być efektem odmiennej lub niepełnej dojrzałości immunologicznej komórek MSC pochodzenia płodowego wyrażonej m.in. niską ekspresją receptorów TLR α . Transplantacja ludzkich WJ-MSC i WJ-EPC do skrawków hipokampa lub okolicy korowo-podkorowej w modelach niedokrwienia mózgu szczura *ex vivo* (OHC) i *in vivo* (OUA), skutkuje zmniejszeniem uszkodzenia ischemicznego tkanki. Uszkodzony ischemicznie *ex vivo* region CA1 skrawków hipokampa reaguje na współhodowlę z badanymi komórkami mezenchymalnymi znamienym zmniejszeniem nekrozy komórek i stabilizacją sieci naczyniowej. W badaniach *in vivo* (trwających do 21 dni po transplantacji komórek) obserwuje się dodatkowo zmniejszenie postischemicznej aktywacji gleju i obniżenie liczby komórek nacieku zapalnego w okolicy uszkodzenia. Zaobserwowano tam również istotne zwiększenie usieciowania naczyń krwionośnych po podaniu WJ-EPC, wskazujące na wzmożone działanie naczynioprotekcyjne komórek mezenchymalnych indukowanych *in vitro* w kierunku endotelialnym. W sumie skutkuje to znamienym statystycznie zmniejszeniem obszaru uszkodzenia mózgu ocenianego metodą morfometryczną.

Vasculo- and neuro-protective ability of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly and endothelial progenitor cells

Stroke is the main cause of morbidity among the middle aged and elderly population and the second cause of death worldwide (Kanyal, 2015). It leads to acute neurologic dysfunction of vascular origin due to lack of blood flow (ischemic stroke) or bleeding (hemorrhagic stroke), which is approximately 85% and 15% cases, respectively. Ischemic stroke is mainly caused by embolism, thrombosis or focal hypoperfusion, which limit or interrupt cerebral blood flow (Stoll, Kleinschnitz i Nieswandt, 2008; Sliem, 2014; Chang i in., 2013). It results in violent impairment of tissue homeostasis, leading to perturbation of proper interactions within the neurovascular unit (NVU) followed by reduction of blood flow, leakage of the blood-brain barrier, infiltration of proinflammatory cells and cytokines, glial activation and finally neuronal damage, which predominantly causes long-term disability (del Zoppo, 2009), (del Zoppo, Moskowitz i Nedergaard, 2016; del Zoppo, 2010).

Nowadays, only available treatments for ischemic stroke are focused on restoration of the blood flow in the affected area by dissolving the clot with thrombolytics or by physically removing the clot with mechanical devices. Unfortunately, both methods are limited due to therapeutic window 4,5-8 hours post onset of stroke symptoms. Moreover, regardless of the treatment ischemic stroke mostly results in long-term neurological disorders (Członkowska i Kobayashi, 2013).

Due to complexity of the response within the NVU to ischemic injury, there is a strong need to find a therapy with a broad spectrum of activity. The increasing number of reports on beneficial influence of mesenchymal stem cells (MSC) in the treatment of numerous pathologies may indicate them to be promising candidates for "holistic" tissue therapy (Drela i in., 2014; Tanna i Sachan, 2014). Mesenchymal stem cells attract a lot of attention mainly due to their multilineage differentiation potential and ability to secrete several immunomodulating, antiapoptotic, angiogenic and neurogenic cytokines and growth factors (Tanna i Sachan, 2014; Drela i in., 2016, 2014). Moreover, recent studies suggest that MSC participate in regeneration of ischemically injured brain by forming a biobridge between the neurogenic niche and the site of injury (Duncan i in., 2015).

Wharton's jelly- derived mesenchymal stem cells seem to be the most preferable candidates due to their enhanced neuro-therapeutic potential, low immunogenicity and immunosuppressive/immunomodulatory abilities (Drela i in., 2016). Unfortunately, current research displays inconsistent and relatively moderate benefits of cell therapy, indicating the need to increase the efficiency of therapeutic cells (Prasad i in., 2014; Tyndall, 2011). "Pro-regenerative" stimulation of mesenchymal stem cells may be possible after changing their secretion profile or by inducing differentiation of such cells in desirable cell line. Recent studies have shown that mesenchymal stem cells are able to pliantly react to surrounding microenvironment and change their pro- or anti-inflammatory phenotype by stimulation of Toll-like receptors, what can amplify MSC trophic factors and enhance therapeutic potency (Kota i in., 2014; Waterman i in., 2010; Matri i in., 2012). Moreover, some researchers emphasize the notion that brain ischemia is a vascular disorder,

implying significant role of endothelial progenitor cells (EPC) in the process of recovery of the injured brain (Aguilera i in., 2014). Several studies have proven that administration of endothelial progenitor cells may play an essential role in microvessels regeneration after brain ischemia, contributing in restoration of functional NVU (Clifford, Deacon i Knox, 2008; Wei i in., 2001; Asahara i in., 1999; Sharma i in., 2012). Furthermore, EPC are able to secrete angiogenic, antiapoptotic, neurogenic growth factors and cytokines, like: VEGF-A, B (Greenberg i Jin, 2013), TGF- β 1 (Dobolyi i in., 2012; Clifford, Deacon i Knox, 2008), IL-6 (Lahiani i in., 2015; Perígolo-Vicente i in., 2014) and IL-10 (Segev-Amzaleg, Trudler i Frenkel, 2013; Levin i Godukhin, 2011; Sharma i in., 2011).

The main purpose of this study was to evaluate the vasculo- and neuro-protective ability of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly and endothelial progenitor cells differentiated from these cells.

Studies of this issue consisted of several stages: *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*.

In *in vitro* experiments, the aim was to assess the potential of mesenchymal stem cells originating from Wharton's jelly to differentiating into cells of endothelial lineage able to support vasculature and to evaluate the influence of Toll-like receptors agonists: LPS and Poli:IC, on WJ-MSc/EPC secretosomes.

In *ex vivo* and *in vivo* studies the objective was to investigate and characterize the effect of WJ-MSc/WJ-EPC on vascular network and cell survival in the model of hippocampal organotypic culture (OHC) injured by oxygen-glucose deprivation (OGD) or in the model of cytotoxic brain injury.

For that purpose, WJ-MSc were cultured in expansion medium (MSCGM) or in endothelial differentiating medium (EGM-2). A phenotypic analysis was performed by flow cytometry, immunocytochemistry, RT-PCR and qPCR based on expression of typical markers for mesenchymal and endothelial lineage (CD90, CD73, CD105, vWF, CD31, VEGF, VEGFR2). Expected angiogenic activity of WJ-EPC was estimated *in vitro* by Dil-Ac-LDL-uptake assay and capillary-like structure formation test. Priming of WJ-MSc/WJ-EPC was achieved by stimulation of specific Toll-like receptors with TLR4 agonist- LPS or TLR3 agonist- poly(I:C). The secretion of (human)WJ-MSc/EPC-derived protective factors (IL-6, TGF- β 1 and VEGF) was estimated in culture medium by the BD CBA assays system.

In *ex vivo* part of experiments, hippocampal slices after 5 days of incubation were exposed to OGD. Afterwards, WJ-MSc/WJ-EPC were co-cultured with the intact or post-ischemic slices by the next 2 days. Vascular network in CA1 and CA2/3 region of hippocampus was evaluated with rat endothelium-specific antibody (RECA-1). Survival of cells in these regions was measured by propidium iodide (IP) staining.

In *in vivo* experiments, cytotoxic brain injury was conducted with use of Na⁺/K⁺ pump inhibitor- ouabain. WJ-MSc and WJ-EPC were engrafted in 3D bioactive platelet lysate (PL) scaffolds into the striatum of normal and focally injured brains of adult Wistar rats. After 7, 14 and 21 days brains were isolated and sliced with cryostat. Subsequently, immunohistochemical studies were performed with rat endothelial cell specific antibody (RECA-1), cell proliferation marker (Ki67), astrocyte marker (GFAP) and microglia marker (ED1).

Based on this study we showed that:

- WJ-MSC have a strong potential to differentiate into functional endothelial cells *in vitro*.
- Both cell types express MSC and EC markers CD73, CD90, CD105, VEGFR2, VEGF, but only EPC culture express endothelial-specific vWF and CD31 on significantly higher gene and protein levels.
- WJ-MSC and WJ-EPC secrete neuro/angio-protective growth factor VEGF, anti-inflammatory cytokine TGF- β 1 and the mixed function modulatory IL-6.
- The secretion pattern of WJ-MSC/WJ-EPC remain resistant to stimulation on a low concentration of Toll-like receptors. At higher concentrations of TLR3/4 agonists, WJ-EPC starts to respond with higher secretion of TGF- β 1 and IL-6. VEGF secretion remains stable and insensitive to stimulation in both investigated cell types.
- Relatively low response to TLR3/4 stimulation in investigated cultures can be linked to exceptionally low expression of these receptors in both cell types, which may be a characteristic feature of early developmental MSC originating cells.
- Indirect WJ-MSC or WJ-EPC-like co-cultures with OGD injured hippocampal slices, both inhibit atrophy of blood vessels and cell death in hypoxia-sensitive CA1 region, suggesting their common paracrine protection mechanism.
- Neuroprotective effect on OHC-OGD is slightly more evident under co-culture with WJ-MSC, whereas co-culture with WJ-EPC exhibits stronger angio-protective properties.
- Transplantation of either WJ-MSC or WJ-EPC in the form of platelet lysate (PL) scaffolds significantly reduces infarct volume in focally injured rat brain.
- WJ-MSC as well as WJ-EPC transplantation in the form of PL scaffolds exerts pronounced anti-inflammatory, angio- and neuro-protective effects after their transplantation into striatum of focally injured rat brains.
- Immunohistochemical studies support the higher angio-protective effect of WJ-EPC in comparison with WJ-MSC which, in reverse, exerts stronger neuroprotection.

In summary, the results of our studies indicate that mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly are able to differentiate into functional endothelial progenitor cells *in vitro*. WJ-MSC and WJ-EPC secrete regenerative and neuro/angioprotective growth factor VEGF, anti-inflammatory TGF- β 1 and modulatory IL-6, the last two being potentiated by the Toll-like receptors 3 and 4 stimulation. These responses may contribute to neuro- and vasculo-protection activated by inflammatory postischemic rat brain microenvironment. In both *ex vivo* and *in vivo* experiments WJ-derived cells inhibited cell death and blood vessel atrophy. *In vivo* experiments showed a decrease of astrocyte and microglia activation after transplantation of both cell types, with better outcomes after WJ-MSC- PL transplants and increased blood vessel formation, which was more evident after WJ-EPC- PL injection.

10. Bibliografia

- Ab Kadir, R., Zainal Ariffin, S.H., Megat Abdul Wahab, R., Kermani, S. i Senafi, S., 2012. Characterization of mononucleated human peripheral blood cells. *TheScientificWorldJournal*, 2012, s.843843.
- Abeyasinghe, H.C.S., Phillips, E.L., Chin-Cheng, H., Beart, P.M. i Roulston, C.L., 2016. Modulating Astrocyte Transition after Stroke to Promote Brain Rescue and Functional Recovery: Emerging Targets Include Rho Kinase. *International Journal of Molecular Sciences*, [online] 17(3). Dostępne na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4813152/>> [ostatni dostęp 3.05.2017].
- Abumiya, T., Lucero, J., Heo, J.H., Tagaya, M., Koziol, J.A., Copeland, B.R. i del Zoppo, G.J., 1999. Activated microvessels express vascular endothelial growth factor and integrin alpha(v)beta3 during focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 19(9), ss.1038–1050.
- Adutler-Lieber, S., Ben-Mordechai, T., Naftali-Shani, N., Asher, E., Loberman, D., Raanani, E. i Leor, J., 2013. Human macrophage regulation via interaction with cardiac adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 18(1), ss.78–86.
- Aguilera, V., Briceño, L., Contreras, H., Lamperti, L., Sepúlveda, E., Díaz-Perez, F., León, M., Veas, C., Maura, R., Toledo, J.R., Fernández, P., Covarrubias, A., Zuñiga, F.A., Radojkovic, C., Escudero, C. i Aguayo, C., 2014. Endothelium Trans Differentiated from Wharton's Jelly Mesenchymal Cells Promote Tissue Regeneration: Potential Role of Soluble Pro-Angiogenic Factors. *PLoS ONE*, [online] 9(11). Dostępne na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4239028/>> [ostatni dostęp 24.02.2016].
- Alexanian, A.R., 2010. An efficient method for generation of neural-like cells from adult human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Regenerative Medicine*, 5(6), ss.891–900.
- Allameh, A., Jazayeri, M. i Adelipour, M., 2016. In Vivo Vascularization of Endothelial Cells Derived from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in SCID Mouse Model. *Cell Journal (Yakhteh)*, 18(2), ss.179–188.
- Allickson, J.G., Sanchez, A., Yefimenko, N., Borlongan, C.V. i Sanberg, P.R., 2011. Recent Studies Assessing the Proliferative Capability of a Novel Adult Stem Cell Identified in Menstrual Blood. *The Open Stem Cell Journal*, 3(2011), ss.4–10.
- Aloisi, F., 2001. Immune function of microglia. *Glia*, 36(2), ss.165–179.
- Alvarez-Buylla, A. i Garcia-Verdugo, J.M., 2002. Neurogenesis in adult subventricular zone. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22(3), ss.629–634.
- Anbari, F., Khalili, M.A., Bahrami, A.R., Khoradmehr, A., Sadeghian, F., Fesahat, F. i Nabi, A., 2014. Intravenous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells promotes neural regeneration after traumatic brain injury. *Neural Regeneration Research*, 9(9), ss.919–923.
- Anderson, J.D., Pham, M.T., Contreras, Z., Hoon, M., Fink, K.D., Johansson, H.J., Rossignol, J., Dunbar, G.L., Showalter, M., Fiehn, O., Bramlett, C.S., Bardini, R.L., Bauer, G., Fury, B., Hendrix, K.J., Chedin, F., EL-Andaloussi, S., Hwang, B., Mulligan, M.S., Lehtiö, J. i Nolta, J.A., 2016. Mesenchymal stem cell-based therapy for ischemic stroke. *Chinese Neurosurgical Journal*, 2, s.36.
- Andreu-Agulló, C., Morante-Redolat, J.M., Delgado, A.C. i Fariñas, I., 2009. Vascular niche factor PEDF modulates Notch-dependent stemness in the adult subependymal zone. *Nature Neuroscience*, 12(12), ss.1514–1523.

Anghileri, E., Marconi, S., Pignatelli, A., Cifelli, P., Galié, M., Sbarbati, A., Krampera, M., Belluzzi, O. i Bonetti, B., 2008. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 17(5), ss.909–916.

Anon 2017. *Cytotoxicity WST-1*. [online] Dostępne na: <<http://radio.cuci.udg.mx/bch/EN/Cytotox.html>> [ostatni dostęp 10.01.2017].

Armao, D., Kornfeld, M., Estrada, E.Y., Grossetete, M. i Rosenberg, G.A., 1997. Neutral proteases and disruption of the blood-brain barrier in rat. *Brain Research*, 767(2), ss.259–264.

Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M. i Isner, J.M., 1999. Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization. *Circulation Research*, 85(3), ss.221–228.

Aschner, J.L., Lum, H., Fletcher, P.W. i Malik, A.B., 1997. Bradykinin- and thrombin-induced increases in endothelial permeability occur independently of phospholipase C but require protein kinase C activation. *Journal of Cellular Physiology*, 173(3), ss.387–396.

Bai, L., Li, D., Li, J., Luo, Z., Yu, S., Cao, S., Shen, L., Zuo, Z. i Ma, X., 2016. Bioactive molecules derived from umbilical cord mesenchymal stem cells. *Acta Histochemica*, 118(8), ss.761–769.

Banerjee, S., Bentley, P., Hamady, M., Marley, S., Davis, J., Shlebak, A., Nicholls, J., Williamson, D.A., Jensen, S.L., Gordon, M., Habib, N. i Chataway, J., 2014. Intra-Arterial Immunoselected CD34+ Stem Cells for Acute Ischemic Stroke. *Stem Cells Translational Medicine*, 3(11), ss.1322–1330.

Bang, O.Y., Kim, E.H., Cha, J.M. i Moon, G.J., 2016. Adult Stem Cell Therapy for Stroke: Challenges and Progress. *Journal of Stroke*, 18(3), ss.256–266.

Bang, O.Y., Lee, J.S., Lee, P.H. i Lee, G., 2005. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Annals of Neurology*, 57(6), ss.874–882.

Bao, X., Feng, M., Wei, J., Han, Q., Zhao, H., Li, G., Zhu, Z., Xing, H., An, Y., Qin, C., Zhao, R.C. i Wang, R., 2011. Transplantation of Flk-1+ human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *European Journal of Neuroscience*, 34(1), ss.87–98.

Bartsch, G., Yoo, J.J., De Coppi, P., Siddiqui, M.M., Schuch, G., Pohl, H.G., Fuhr, J., Perin, L., Soker, S. i Atala, A., 2005. Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors. *Stem Cells and Development*, 14(3), ss.337–348.

Barzilay, R., Ben-Zur, T., Bulvik, S., Melamed, E. i Offen, D., 2009. Lentiviral delivery of LMX1a enhances dopaminergic phenotype in differentiated human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 18(4), ss.591–601.

Beck, H. i Plate, K.H., 2009. Angiogenesis after cerebral ischemia. *Acta Neuropathologica*, 117(5), ss.481–496.

Bell, R.D., Winkler, E.A., Sagare, A.P., Singh, I., LaRue, B., Deane, R. i Zlokovic, B.V., 2010. Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron*, 68(3), ss.409–427.

Benner, E.J., Luciano, D., Jo, R., Abdi, K., Paez-Gonzalez, P., Sheng, H., Warner, D.S., Liu, C., Eroglu, C. i Kuo, C.T., 2013. Protective astrogenesis from the SVZ niche after injury is controlled by Notch modulator Thbs4. *Nature*, 497(7449), ss.369–373.

Bennett, L., Yang, M., Enikolopov, G. i Iacovitti, L., 2009. Circumventricular Organs: A Novel Site of Neural Stem Cells in the Adult Brain. *Molecular and cellular neurosciences*, 41(3), ss.337–347.

- Bhang, S.H., Lee, S., Shin, J.-Y., Lee, T.-J., Jang, H.-K. i Kim, B.-S., 2014. Efficacious and clinically relevant conditioned medium of human adipose-derived stem cells for therapeutic angiogenesis. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 22(4), ss.862–872.
- Boomsma, R.A. i Geenen, D.L., 2012. Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis. *PLoS One*, 7(4), s.e35685.
- Botto, S., Streblow, D.N., DeFilippis, V., White, L., Kreklywich, C.N., Smith, P.P. i Caposio, P., 2011. IL-6 in human cytomegalovirus secretome promotes angiogenesis and survival of endothelial cells through the stimulation of survivin. *Blood*, 117(1), ss.352–361.
- Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Hu, W.-H., Frydel, B., Bramwell, A., Karmally, S., Green, E.J. i Bethea, J.R., 2005. Inhibition of astroglial nuclear factor κ B reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *Journal of Experimental Medicine*, 202(1), ss.145–156.
- Busser, H., Najar, M., Raicevic, G., Pieters, K., Velez Pombo, R., Philippart, P., Meuleman, N., Bron, D. i Lagneaux, L., 2015. Isolation and Characterization of Human Mesenchymal Stromal Cell Subpopulations: Comparison of Bone Marrow and Adipose Tissue. *Stem Cells and Development*, 24(18), ss.2142–2157.
- Camilleri, E.T., Gustafson, M.P., Dudakovic, A., Riester, S.M., Garces, C.G., Paradise, C.R., Takai, H., Karperien, M., Cool, S., Sampen, H.-J.I., Larson, A.N., Qu, W., Smith, J., Dietz, A.B. i van Wijnen, A.J., 2016. Identification and validation of multiple cell surface markers of clinical-grade adipose-derived mesenchymal stromal cells as novel release criteria for good manufacturing practice-compliant production. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), s.107.
- Caplan, A.I., 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 9(5), ss.641–650.
- Carmeliet, P. i Collen, D., 2000. Molecular basis of angiogenesis. Role of VEGF and VE-cadherin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 902, ss.249-262; discussion 262-264.
- Cayre, M., Courtès, S., Martineau, F., Giordano, M., Arnaud, K., Zamaron, A. i Durbec, P., 2013. Netrin 1 contributes to vascular remodeling in the subventricular zone and promotes progenitor emigration after demyelination. *Development (Cambridge, England)*, 140(15), ss.3107–3117.
- Ceusters, J., Lejeune, J.-P., Sandersen, C., Niesten, A., Lagneaux, L. i Serteyn, D., 2017. From skeletal muscle to stem cells: an innovative and minimally-invasive process for multiple species. *Scientific Reports*, 7(1), s.696.
- Chang, Y.-L., Hung, S.-H., Ling, W., Lin, H.-C., Li, H.-C. i Chung, S.-D., 2013. Association between Ischemic Stroke and Iron-Deficiency Anemia: A Population-Based Study. *PLOS ONE*, 8(12), s.e82952.
- Chen, A., Oakley, A.E., Monteiro, M., Tuomela, K., Allan, L.M., Mukaetova-Ladinska, E.B., O'Brien, J.T. i Kalaria, R.N., 2016. Multiplex analyte assays to characterize different dementias: brain inflammatory cytokines in poststroke and other dementias. *Neurobiology of Aging*, 38, ss.56–67.
- Chen, M.-Y., Lie, P.-C., Li, Z.-L. i Wei, X., 2009. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*, 37(5), ss.629–640.
- Cheng, C.-C., Chang, S.-J., Chueh, Y.-N., Huang, T.-S., Huang, P.-H., Cheng, S.-M., Tsai, T.-N., Chen, J.-W. i Wang, H.-W., 2013. Distinct angiogenesis roles and surface markers of early and late endothelial progenitor cells revealed by functional group analyses. *BMC Genomics*, 14, s.182.
- Chip, S., Nitsch, C., Wellmann, S. i Kapfhammer, J.P., 2013. Subfield-specific neurovascular remodeling in the entorhino-hippocampal-organotypic slice culture as a response to oxygen-glucose deprivation and excitotoxic

cell death. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 33(4), ss.508–518.

Choi, Y.-S., Noh, S.-E., Lim, S.-M., Lee, C.-W., Kim, C.-S., Im, M.-W., Lee, M.-H. i Kim, D.-I., 2008. Multipotency and growth characteristic of periosteum-derived progenitor cells for chondrogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Biotechnology Letters*, 30(4), ss.593–601.

Choi, Y.S., Park, Y.-B., Ha, C.-W., Kim, J.A., Heo, J.-C., Han, W.-J., Oh, S.-Y. i Choi, S.-J., 2017. Different characteristics of mesenchymal stem cells isolated from different layers of full term placenta. *PLoS One*, 12(2), s.e0172642.

Chomczynski, P. i Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), ss.156–159.

Clark, W.M., 1997. Cytokines and reperfusion injury. *Neurology*, 49(5 Suppl 4), ss.S10-14.

Clifford, R.L., Deacon, K. i Knox, A.J., 2008. Novel Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) by Transforming Growth Factor β 1 REQUIREMENT FOR Smads, β -CATENIN, AND GSK3 β . *Journal of Biological Chemistry*, 283(51), ss.35337–35353.

Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P.-N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B.M., Badyrak, S., Buhring, H.-J., Jacobino, J.-P., Lazzari, L., Huard, J. i Péault, B., 2008. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 3(3), ss.301–313.

Cuthbert, R.J., Giannoudis, P.V., Wang, X.N., Nicholson, L., Pawson, D., Lubenko, A., Tan, H.B., Dickinson, A., McGonagle, D. i Jones, E., 2015. Examining the Feasibility of Clinical Grade CD271+ Enrichment of Mesenchymal Stromal Cells for Bone Regeneration. *PLoS ONE*, [online] 10(3). Dostępne na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4356586/>>.

Członkowska, A., Gromadzka, G. i Członkowski, A., 2005. Cytokiny w niedokrwieniu mózgu. W: J.B. Strosznajder i Z. Czernicki, red., *Mózg a niedokrwienie*. Kraków: PLATAN, ss. 91–111.

Członkowska, A. i Kobayashi, A., 2013. Postępowanie w udarze mózgu – wytyczne Grupy Ekspertów Sekcji Chorób Naczyniowych Polskiego Towarzystwa Neurologicznego. Aktualizacja 2013: leczenie trombolityczne. *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, 47(4), ss.303–309.

Datta, I., Mishra, S., Mohanty, L., Pulikkot, S. i Joshi, P.G., 2011. Neuronal plasticity of human Wharton's jelly mesenchymal stromal cells to the dopaminergic cell type compared with human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 13(8), ss.918–932.

De Becker, A. i Riet, I.V., 2016. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World Journal of Stem Cells*, 8(3), ss.73–87.

De Ugarte, D.A., Alfonso, Z., Zuk, P.A., Elbarbary, A., Zhu, M., Ashjian, P., Benhaim, P., Hedrick, M.H. i Fraser, J.K., 2003. Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunology Letters*, 89(2–3), ss.267–270.

Defilippi, P., Silengo, L. i Tarone, G., 1992. Alpha 6.beta 1 integrin (laminin receptor) is down-regulated by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta in human endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(26), ss.18303–18307.

Deng, M., Gu, Y., Liu, Z., Qi, Y., Ma, G.E. i Kang, N., 2015. Endothelial Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells on Polyglycolic Acid/Poly(lactic Acid) Mesh. *Stem Cells International*, [online] 2015. Dostępne na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4464689/>> [ostatni dostęp 20.04.2017].

- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanesi, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S. i Gianni, A.M., 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10), ss.3838–3843.
- Di Santo, S., Seiler, S., Fuchs, A.-L., Staudigl, J. i Widmer, H.R., 2014. The secretome of endothelial progenitor cells promotes brain endothelial cell activity through PI3-kinase and MAP-kinase. *PLoS One*, 9(4), s.e95731.
- Dobolyi, A., Vincze, C., Pál, G. i Lovas, G., 2012. The neuroprotective functions of transforming growth factor beta proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), ss.8219–8258.
- Domańska-Janik, K., Bronisz-Kowalczyk, A., Zajac, H. i Zabłocka, B., 2001. Interrelations between nuclear-factor kappa B activation, glial response and neuronal apoptosis in gerbil hippocampus after ischemia. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 61(1), ss.45–51.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. i Horwitz, E., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), ss.315–317.
- Dong, Y. i Benveniste, E.N., 2001. Immune function of astrocytes. *Glia*, 36(2), ss.180–190.
- Douet, V., Arikawa-Hirasawa, E. i Mercier, F., 2012. Fractone-heparan sulfates mediate BMP-7 inhibition of cell proliferation in the adult subventricular zone. *Neuroscience Letters*, 528(2), ss.120–125.
- Dreier, J.P., 2011. The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nature Medicine*, 17(4), ss.439–447.
- Drela, K., Lech, W., Figiel-Dabrowska, A., Zychowicz, M., Mikula, M., Sarnowska, A. i Domanska-Janik, K., 2016. Enhanced neuro-therapeutic potential of Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells culture. *Cytotherapy*, 18(4), ss.497–509.
- Drela, K., Sarnowska, A., Siedlecka, P., Szablowska-Gadomska, I., Wielgos, M., Jurga, M., Lukomska, B. i Domanska-Janik, K., 2014. Low oxygen atmosphere facilitates proliferation and maintains undifferentiated state of umbilical cord mesenchymal stem cells in an hypoxia inducible factor-dependent manner. *Cytotherapy*, 16(7), ss.881–892.
- D'souza, N., Rossignoli, F., Golinelli, G., Grisendi, G., Spano, C., Candini, O., Osturu, S., Catani, F., Paolucci, P., Horwitz, E.M. i Dominici, M., 2015. Mesenchymal stem/stromal cells as a delivery platform in cell and gene therapies. *BMC Medicine*, [online] 13. Dostępne na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4534031/>> [ostatni dostęp 22.04.2017].
- Duncan, K., Gonzales-Portillo, G.S., Acosta, S., Kaneko, Y., Borlongan, C.V. i Tajiri, N., 2015. Stem Cell-Paved Biobridges Facilitate Stem Transplant and Host Brain Cell Interactions for Stroke Therapy. *Brain research*, 1623, ss.160–165.
- Ernst, A. i Frisén, J., 2015. Adult Neurogenesis in Humans- Common and Unique Traits in Mammals. *PLoS Biology*, [online] 13(1). Dostępne na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4306487/>> [ostatni dostęp 27.04.2017].
- Fairbairn, N.G., Meppelink, A.M., Ng-Glazier, J., Randolph, M.A. i Winograd, J.M., 2015. Augmenting peripheral nerve regeneration using stem cells: A review of current opinion. *World Journal of Stem Cells*, 7(1), ss.11–26.
- Fan, Y., Shen, F., Frenzel, T., Zhu, W., Ye, J., Liu, J., Chen, Y., Su, H., Young, W.L. i Yang, G.-Y., 2010. Endothelial progenitor cell transplantation improves long-term stroke outcome in mice. *Annals of Neurology*, 67(4), ss.488–497.

- Fan, Y. i Yang, G.-Y., 2007. Therapeutic angiogenesis for brain ischemia: a brief review. *Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 2(3), ss.284–289.
- Fanti, M., Gramignoli, R., Serra, M., Cadoni, E., Strom, S.C. i Marongiu, F., 2017. Differentiation of amniotic epithelial cells into various liver cell types and potential therapeutic applications. *Placenta*.
- Felling, R.J., Snyder, M.J., Romanko, M.J., Rothstein, R.P., Ziegler, A.N., Yang, Z., Givogri, M.I., Bongarzone, E.R. i Levison, S.W., 2006. Neural stem/progenitor cells participate in the regenerative response to perinatal hypoxia/ischemia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(16), ss.4359–4369.
- Finney, M.R., Greco, N.J., Haynesworth, S.E., Martin, J.M., Hedrick, D.P., Swan, J.Z., Winter, D.G., Kadereit, S., Joseph, M.E., Fu, P., Pompili, V.J. i Laughlin, M.J., 2006. Direct comparison of umbilical cord blood versus bone marrow-derived endothelial precursor cells in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 12(5), ss.585–593.
- Fortunato, T.M., Beltrami, C., Emanuelli, C., De Bank, P.A. i Pula, G., 2016. Platelet lysate gel and endothelial progenitors stimulate microvascular network formation in vitro: tissue engineering implications. *Scientific Reports*, [online] 6. Dostępne na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4855184/>> [ostatni dostęp 1.02.2017].
- Fukuda, S., Fini, C.A., Mabuchi, T., Koziol, J.A., Eggleston, L.L. i del Zoppo, G.J., 2004. Focal cerebral ischemia induces active proteases that degrade microvascular matrix. *Stroke*, 35(4), ss.998–1004.
- Fukuda, Y., Horie, N., Satoh, K., Yamaguchi, S., Morofuji, Y., Hiu, T., Izumo, T., Hayashi, K., Nishida, N. i Nagata, I., 2015. Intra-arterial transplantation of low-dose stem cells provides functional recovery without adverse effects after stroke. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35(3), ss.399–406.
- Gage, F.H., 2000. Mammalian neural stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5457), ss.1433–1438.
- Gang, E.J., Jeong, J.A., Han, S., Yan, Q., Jeon, C.-J. i Kim, H., 2006. In vitro endothelial potential of human UC blood-derived mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 8(3), ss.215–227.
- Gertz, K., Kronenberg, G., Kälin, R.E., Baldinger, T., Werner, C., Balkaya, M., Eom, G.D., Hellmann-Regen, J., Kröber, J., Miller, K.R., Lindauer, U., Laufs, U., Dirnagl, U., Heppner, F.L. i Endres, M., 2012. Essential role of interleukin-6 in post-stroke angiogenesis. *Brain: A Journal of Neurology*, 135(Pt 6), ss.1964–1980.
- Giunti, D., Parodi, B., Usai, C., Vergani, L., Casazza, S., Bruzzone, S., Mancardi, G. i Uccelli, A., 2012. Mesenchymal stem cells shape microglia effector functions through the release of CX3CL1. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 30(9), ss.2044–2053.
- Gonzales, C., Lin, R.C. i Chesselet, M.F., 1992. Relative sparing of GABAergic interneurons in the striatum of gerbils with ischemia-induced lesions. *Neuroscience Letters*, 135(1), ss.53–58.
- Gould, E., 2007. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nature Reviews. Neuroscience*, 8(6), ss.481–488.
- Gómez-Gaviro, M.V., Scott, C.E., Sesay, A.K., Matheu, A., Booth, S., Galichet, C. i Lovell-Badge, R., 2012. Betacellulin promotes cell proliferation in the neural stem cell niche and stimulates neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(4), ss.1317–1322.
- Grade, S., Weng, Y.C., Snapyan, M., Kriz, J., Malva, J.O. i Saghatelian, A., 2013. Brain-derived neurotrophic factor promotes vasculature-associated migration of neuronal precursors toward the ischemic striatum. *PLoS One*, 8(1), s.e55039.

- Greenberg, D.A. i Jin, K., 2013. Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs) and Stroke. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 70(10), ss.1753–1761.
- Gu, Y., He, M., Zhou, X., Liu, J., Hou, N., Bin, T., Zhang, Y., Li, T. i Chen, J., 2016. Endogenous IL-6 of mesenchymal stem cell improves behavioral outcome of hypoxic-ischemic brain damage neonatal rats by suppressing apoptosis in astrocyte. *Scientific Reports*, 6, s.18587.
- Guan, X.M., Guan, X.M., Cheng, M., Cheng, M., Li, H., Li, H., Cui, X.D., Cui, X.D., Li, X., Li, X., Wang, Y.L., Wang, Y.L., Sun, J.L., Sun, J.L., Zhang, X.Y. i Zhang, X.Y., 2013. Biological properties of bone marrow-derived early and late endothelial progenitor cells in different culture media. *Molecular Medicine Reports*, 8(6), ss.1722–1728.
- Guo, F., Lv, S., Lou, Y., Tu, W., Liao, W., Wang, Y. i Deng, Z., 2012. Bone marrow stromal cells enhance the angiogenesis in ischaemic cortex after stroke: involvement of notch signalling. *Cell Biology International*, 36(11), ss.997–1004.
- Hamann, G.F., Okada, Y. i del Zoppo, G.J., 1996. Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 16(6), ss.1373–1378.
- Hao, L., Zou, Z., Tian, H., Zhang, Y., Zhou, H. i Liu, L., 2014. Stem Cell-Based Therapies for Ischemic Stroke. *BioMed Research International*, 2014, s.e468748.
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S. i Jacobs, R., 2011. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling : CCS*, 9, s.12.
- Hawkins, B.T., Gu, Y.-H., Izawa, Y. i Del Zoppo, G.J., 2013. Disruption of dystroglycan-laminin interactions modulates water uptake by astrocytes. *Brain Research*, 1503, ss.89–96.
- Hayashi, T., Noshita, N., Sugawara, T. i Chan, P.H., 2003. Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 23(2), ss.166–180.
- Hayon, Y., Dashevsky, O., Shai, E., Brill, A., Varon, D. i Leker, R.R., 2012a. Platelet microparticles induce angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia. *Current Neurovascular Research*, 9(3), ss.185–192.
- Hayon, Y., Dashevsky, O., Shai, E., Varon, D. i Leker, R.R., 2012b. Platelet microparticles promote neural stem cell proliferation, survival and differentiation. *Journal of molecular neuroscience: MN*, 47(3), ss.659–665.
- Hayon, Y., Dashevsky, O., Shai, E., Varon, D. i Leker, R.R., 2013. Platelet lysates stimulate angiogenesis, neurogenesis and neuroprotection after stroke. *Thrombosis and Haemostasis*, 110(2), ss.323–330.
- Heo, J.H., Lucero, J., Abumiya, T., Koziol, J.A., Copeland, B.R. i del Zoppo, G.J., 1999. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 19(6), ss.624–633.
- Hermann, A., Gastl, R., Liebau, S., Popa, M.O., Fiedler, J., Boehm, B.O., Maisel, M., Lerche, H., Schwarz, J., Brenner, R. i Storch, A., 2004. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *Journal of Cell Science*, 117(19), ss.4411–4422.
- Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., Keating, A. i International Society for Cellular Therapy, 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5), ss.393–395.

- Hsieh, J.-Y., Wang, H.-W., Chang, S.-J., Liao, K.-H., Lee, I.-H., Lin, W.-S., Wu, C.-H., Lin, W.-Y. i Cheng, S.-M., 2013. Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis. *PLoS One*, 8(8), s.e72604.
- Huang, G.T.-J., Gronthos, S. i Shi, S., 2009. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of Dental Research*, 88(9), ss.792–806.
- Huang, N.F. i Li, S., 2008. Mesenchymal stem cells for vascular regeneration. *Regenerative medicine*, 3(6), ss.877–892.
- Hur, J., Yoon, C.-H., Kim, H.-S., Choi, J.-H., Kang, H.-J., Hwang, K.-K., Oh, B.-H., Lee, M.-M. i Park, Y.-B., 2004. Characterization of Two Types of Endothelial Progenitor Cells and Their Different Contributions to Neovascularization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(2), ss.288–293.
- Im, G.-I., Shin, Y.-W. i Lee, K.-B., 2005. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis and Cartilage*, 13(10), ss.845–853.
- In 't Anker, P.S., Scherjon, S.A., Kleijburg-van der Keur, C., Noort, W.A., Claas, F.H.J., Willemze, R., Fibbe, W.E. i Kanhai, H.H.H., 2003. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*, 102(4), ss.1548–1549.
- Janowski, M., Gornicka-Pawlak, E., Kozłowska, H., Domanska-Janik, K., Gielecki, J. i Lukomska, B., 2008. Structural and functional characteristic of a model for deep-seated lacunar infarct in rats. *Journal of the Neurological Sciences*, 273(1–2), ss.40–48.
- Jiang, W., Liang, G., Li, X., Li, Z., Gao, X., Feng, S., Wang, X., Liu, M. i Liu, Y., 2014. Intracarotid transplantation of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells significantly improves neurological deficits in rats after MCAo. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 25(5), ss.1357–1366.
- Jiang, X.-X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S.-X., Wu, Y., Yu, X.-D. i Mao, N., 2005. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 105(10), ss.4120–4126.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A. i Verfaillie, C.M., 2002. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418(6893), ss.41–49.
- Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X.O., Xie, L. i Greenberg, D.A., 2002. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(18), ss.11946–11950.
- Kalaszczynska, I. i Ferdyn, K., 2015. Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells: future of regenerative medicine? Recent findings and clinical significance. *BioMed Research International*, 2015, s.430847.
- Kang, S.K., Lee, D.H., Bae, Y.C., Kim, H.K., Baik, S.Y. i Jung, J.S., 2003. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Experimental Neurology*, 183(2), ss.355–366.
- Kanyal, N., 2015. The Science of Ischemic Stroke: Pathophysiology & Pharmacological Treatment. *International Journal of Pharma Research & Review*, [online] 4(10). Dostępne na: <<https://www.omicsonline.org/scholarly-articles/the-science-of-ischemic-stroke-pathophysiology-pharmacological-treatment-65087.html>> [ostatni dostęp 23.01.2017].
- Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E., Kara, F., Akay, G.G., Demiralp, D.O., Tukun, A., Uckan, D. i Can, A., 2007. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(2), ss.319–331.

- Karahuseyinoglu, S., Kocaefe, C., Balci, D., Erdemli, E. i Can, A., 2008. Functional structure of adipocytes differentiated from human umbilical cord stroma-derived stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26(3), ss.682–691.
- Kilic, E., Kilic, U., Wang, Y., Bassetti, C.L., Marti, H.H. i Hermann, D.M., 2006. The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates VEGF's neuroprotective activity and induces blood brain barrier permeability after focal cerebral ischemia. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(8), ss.1185–1187.
- Koh, S.-H., Kim, K.S., Choi, M.R., Jung, K.H., Park, K.S., Chai, Y.G., Roh, W., Hwang, S.J., Ko, H.-J., Huh, Y.-M., Kim, H.-T. i Kim, S.H., 2008. Implantation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells as a neuroprotective therapy for ischemic stroke in rats. *Brain Research*, 1229, ss.233–248.
- Kojima, T., Hirota, Y., Ema, M., Takahashi, S., Miyoshi, I., Okano, H. i Sawamoto, K., 2010. Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 28(3), ss.545–554.
- Kokovay, E., Goderie, S., Wang, Y., Lotz, S., Lin, G., Sun, Y., Roysam, B., Shen, Q. i Temple, S., 2010. Adult SVZ lineage cells home to and leave the vascular niche via differential responses to SDF1/CXCR4 signaling. *Cell Stem Cell*, 7(2), ss.163–173.
- König, J., Huppertz, B., Desoye, G., Parolini, O., Fröhlich, J.D., Weiss, G., Dohr, G., Sedlmayr, P. i Lang, I., 2012. Amnion-derived mesenchymal stromal cells show angiogenic properties but resist differentiation into mature endothelial cells. *Stem Cells and Development*, 21(8), ss.1309–1320.
- Konno, M., Hamazaki, T.S., Fukuda, S., Tokuhara, M., Uchiyama, H., Okazawa, H., Okochi, H. i Asashima, M., 2010. Efficiently differentiating vascular endothelial cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in serum-free culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 400(4), ss.461–465.
- Kota, D.J., DiCarlo, B., Hetz, R.A., Smith, P., Cox, C.S. i Olson, S.D., 2014. Differential MSC activation leads to distinct mononuclear leukocyte binding mechanisms. *Scientific Reports*, 4, s.4565.
- Kozłowska, H., Jabłonka, J., Janowski, M., Jurga, M., Kossut, M. i Domańska-Janik, K., 2007. Transplantation of a novel human cord blood-derived neural-like stem cell line in a rat model of cortical infarct. *Stem Cells and Development*, 16(3), ss.481–488.
- Kubo, Y., Suzuki, M., Kudo, A., Yoshida, K., Suzuki, T., Ogasawara, K., Ogawa, A., Kurose, A. i Sawai, T., 2000. Thrombin inhibitor ameliorates secondary damage in rat brain injury: suppression of inflammatory cells and vimentin-positive astrocytes. *Journal of Neurotrauma*, 17(2), ss.163–172.
- Kurozumi, K., Nakamura, K., Tamiya, T., Kawano, Y., Kobune, M., Hirai, S., Uchida, H., Sasaki, K., Ito, Y., Kato, K., Honmou, O., Houkin, K., Date, I. i Hamada, H., 2004. BDNF Gene-Modified Mesenchymal Stem Cells Promote Functional Recovery and Reduce Infarct Size in the Rat Middle Cerebral Artery Occlusion Model. *Molecular Therapy*, 9(2), ss.189–197.
- Kwon, H.M., Hur, S.-M., Park, K.-Y., Kim, C.-K., Kim, Y.-M., Kim, H.-S., Shin, H.-C., Won, M.-H., Ha, K.-S., Kwon, Y.-G., Lee, D.H. i Kim, Y.-M., 2014. Multiple paracrine factors secreted by mesenchymal stem cells contribute to angiogenesis. *Vascular Pharmacology*, 63(1), ss.19–28.
- Kyurkchiev, D., Bochev, I., Ivanova-Todorova, E., Mourdjeva, M., Oreshkova, T., Belemezova, K. i Kyurkchiev, S., 2014. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 6(5), ss.552–570.
- Lacar, B., Herman, P., Platel, J.-C., Kubera, C., Hyder, F. i Bordey, A., 2012. Neural progenitor cells regulate capillary blood flow in the postnatal subventricular zone. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(46), ss.16435–16448.

- Lahiani, A., Zahavi, E., Netzer, N., Ofir, R., Pinzur, L., Raveh, S., Arien-Zakay, H., Yavin, E. i Lazarovici, P., 2015. Human placental eXpanded (PLX) mesenchymal-like adherent stromal cells confer neuroprotection to nerve growth factor (NGF)-differentiated PC12 cells exposed to ischemia by secretion of IL-6 and VEGF. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1853(2), ss.422–430.
- Le Magueresse, C., Alfonso, J., Bark, C., Eliava, M., Khrulev, S. i Monyer, H., 2012. Subventricular zone-derived neuroblasts use vasculature as a scaffold to migrate radially to the cortex in neonatal mice. *Cerebral Cortex (New York, N.Y.: 1991)*, 22(10), ss.2285–2296.
- Lech, W., Figiel-Dabrowska, A., Sarnowska, A., Drela, K., Obtulowicz, P., Noszczyk, B.H., Buzanska, L. i Domanska-Janik, K., 2016. Phenotypic, Functional, and Safety Control at Preimplantation Phase of MSC-Based Therapy. *Stem Cells International*, 2016, s.2514917.
- Lee, B., Clarke, D., Al Ahmad, A., Kahle, M., Parham, C., Auckland, L., Shaw, C., Fidanboyly, M., Orr, A.W., Ogunshola, O., Fertala, A., Thomas, S.A. i Bix, G.J., 2011. Perlecan domain V is neuroprotective and proangiogenic following ischemic stroke in rodents. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(8), ss.3005–3023.
- Lee, O.K., Kuo, T.K., Chen, W.-M., Lee, K.-D., Hsieh, S.-L. i Chen, T.-H., 2004. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 103(5), ss.1669–1675.
- Lee, S.Y., Kwon, B., Lee, K., Son, Y.H. i Chung, S.G., 2017. Therapeutic Mechanisms of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Rat Tendon Injury Model. *The American Journal of Sports Medicine*, s.363546517689874.
- Leu, S., Lin, Y.-C., Yuen, C.-M., Yen, C.-H., Kao, Y.-H., Sun, C.-K. i Yip, H.-K., 2010. Adipose-derived mesenchymal stem cells markedly attenuate brain infarct size and improve neurological function in rats. *Journal of Translational Medicine*, 8, s.63.
- Levin, S.G. i Godukhin, O.V., 2011. Anti-inflammatory cytokines, TGF- β 1 and IL-10, exert anti-hypoxic action and abolish posthypoxic hyperexcitability in hippocampal slice neurons: Comparative aspects. *Experimental Neurology*, 232(2), ss.329–332.
- Li, G., Yu, F., Lei, T., Gao, H., Li, P., Sun, Y., Huang, H. i Mu, Q., 2016a. Bone marrow mesenchymal stem cell therapy in ischemic stroke: mechanisms of action and treatment optimization strategies. *Neural Regeneration Research*, 11(6), ss.1015–1024.
- Li, J., Zhu, H., Liu, Y., Li, Q., Lu, S., Feng, M., Xu, Y., Huang, L., Ma, C., An, Y., Zhao, R.C., Wang, R. i Qin, C., 2010. Human mesenchymal stem cell transplantation protects against cerebral ischemic injury and upregulates interleukin-10 expression in Macaca fascicularis. *Brain Research*, 1334, ss.65–72.
- Li, Q., Xia, S., Fang, H., Pan, J., Jia, Y. i Deng, G., 2017. VEGF treatment promotes bone marrow-derived CXCR4(+) mesenchymal stromal stem cell differentiation into vessel endothelial cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13(2), ss.449–454.
- Li, S., Wang, X., Li, J., Zhang, J., Zhang, F., Hu, J., Qi, Y., Yan, B. i Li, Q., 2016b. Advances in the Treatment of Ischemic Diseases by Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells International*, [online] 2016. Dostępne na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4886089/>> [ostatni dostęp 22.04.2017].
- Li, Y.-F., Ren, L.-N., Guo, G., Cannella, L.A., Chernaya, V., Samuel, S., Liu, S.-X., Wang, H. i Yang, X.-F., 2015. Endothelial progenitor cells in ischemic stroke: an exploration from hypothesis to therapy. *Journal of Hematology & Oncology*, [online] 8. Dostępne na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4446087/>> [ostatni dostęp 16.05.2017].
- Liang, X., Ding, Y., Zhang, Y., Tse, H.-F. i Lian, Q., 2014. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell Transplantation*, 23(9), ss.1045–1059.

- Liman, T.G. i Endres, M., 2012. New Vessels after Stroke: Postischemic Neovascularization and Regeneration. *Cerebrovascular Diseases*, 33(5), ss.492–499.
- Lin, C.-S., Ning, H., Lin, G. i Lue, T.F., 2012. Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? *Cytotherapy*, 14(10), ss.1159–1163.
- Lin, M., Jackson, P., Tester, A.M., Diaconu, E., Overall, C.M., Blalock, J.E. i Pearlman, E., 2008. Matrix metalloproteinase-8 facilitates neutrophil migration through the corneal stromal matrix by collagen degradation and production of the chemotactic peptide Pro-Gly-Pro. *The American Journal of Pathology*, 173(1), ss.144–153.
- Lindner, U., Kramer, J., Rohwedel, J. i Schlenke, P., 2010a. Mesenchymal Stem or Stromal Cells: Toward a Better Understanding of Their Biology? *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 37(2), ss.75–83.
- Lindner, U., Kramer, J., Rohwedel, J. i Schlenke, P., 2010b. Mesenchymal Stem or Stromal Cells: Toward a Better Understanding of Their Biology? *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 37(2), ss.75–83.
- Liu, F.J., Kaur, P., Karolina, D.S., Sepramaniam, S., Armugam, A., Wong, P.T.H. i Jeyaseelan, K., 2015. MiR-335 Regulates Hif-1 α to Reduce Cell Death in Both Mouse Cell Line and Rat Ischemic Models. *PloS One*, 10(6), s.e0128432.
- Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y. i Wang, Y., 2014. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death and Differentiation*, 21(2), ss.216–225.
- Mabuchi, T., Lucero, J., Feng, A., Koziol, J.A. i del Zoppo, G.J., 2005. Focal cerebral ischemia preferentially affects neurons distant from their neighboring microvessels. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 25(2), ss.257–266.
- Mafi, R., Hindocha, S., Mafi, P., Griffin, M. i Khan, W., 2011. Sources of Adult Mesenchymal Stem Cells Applicable for Musculoskeletal Applications - A Systematic Review of the Literature. *The Open Orthopaedics Journal*, 5, ss.242–248.
- Malinovskaya, N.A., Komleva, Y.K., Salmin, V.V., Morgun, A.V., Shuvaev, A.N., Panina, Y.A., Boitsova, E.B. i Salmina, A.B., 2016. Endothelial Progenitor Cells Physiology and Metabolic Plasticity in Brain Angiogenesis and Blood-Brain Barrier Modeling. *Frontiers in Physiology*, [online] 7. Dostępne na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5130982/>> [ostatni dostęp 17.05.2017].
- Marei, H.E., El-Gamal, A., Althani, A., Afifi, N., Abd-Elmaksoud, A., Farag, A., Cenciarelli, C., Caceci, T. i Hasan, A., 2017. Cholinergic and Dopaminergic Neuronal Differentiation of Human Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Cellular Physiology*.
- Mareschi, K., Novara, M., Rustichelli, D., Ferrero, I., Guido, D., Carbone, E., Medico, E., Madon, E., Vercelli, A. i Fagioli, F., 2006. Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: evidence for expression of neural markers and eag K⁺ channel types. *Experimental Hematology*, 34(11), ss.1563–1572.
- Marneros, A.G. i Olsen, B.R., 2001. The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, 20(5–6), ss.337–345.
- Marti, H.J., Bernaudin, M., Bellail, A., Schoch, H., Euler, M., Petit, E. i Risau, W., 2000. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *The American Journal of Pathology*, 156(3), ss.965–976.
- Maslova, O., Novak, M. i Kruzliak, P., 2015. Umbilical Cord Tissue-Derived Cells as Therapeutic Agents. *Stem Cells International*, 2015, s.e150609.

Mastri, M., Lin, H. i Lee, T., 2014. Enhancing the efficacy of mesenchymal stem cell therapy. *World Journal of Stem Cells*, 6(2), ss.82–93.

Mastri, M., Shah, Z., McLaughlin, T., Greene, C.J., Baum, L., Suzuki, G. i Lee, T., 2012. Activation of Toll-like receptor 3 amplifies mesenchymal stem cell trophic factors and enhances therapeutic potency. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 303(10), ss.C1021-1033.

McGuckin, C.P., Jurga, M., Miller, A.-M., Sarnowska, A., Wiedner, M., Boyle, N.T., Lynch, M.A., Jablonska, A., Drela, K., Lukomska, B., Domanska-Janik, K., Kenner, L., Moriggl, R., Degoul, O., Perruisseau-Carrier, C. i Forraz, N., 2013. Ischemic brain injury: A consortium analysis of key factors involved in mesenchymal stem cell-mediated inflammatory reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 534(1–2), ss.88–97.

Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Göbel, U., Däubener, W. i Dilloo, D., 2004. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*, 103(12), ss.4619–4621.

Milner, R., Hung, S., Wang, X., Berg, G.I., Spatz, M. i del Zoppo, G.J., 2008a. Responses of endothelial cell and astrocyte matrix-integrin receptors to ischemia mimic those observed in the neurovascular unit. *Stroke*, 39(1), ss.191–197.

Milner, R., Hung, S., Wang, X., Spatz, M. i del Zoppo, G.J., 2008b. The rapid decrease in astrocyte-associated dystroglycan expression by focal cerebral ischemia is protease-dependent. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28(4), ss.812–823.

Ming, G. i Song, H., 2011. Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron*, 70(4), ss.687–702.

Mirza, A., Hyvelin, J.-M., Rochefort, G.Y., Lermusiaux, P., Antier, D., Awede, B., Bonnet, P., Domenech, J. i Eder, V., 2008. Undifferentiated mesenchymal stem cells seeded on a vascular prosthesis contribute to the restoration of a physiologic vascular wall. *Journal of Vascular Surgery*, 47(6), ss.1313–1321.

Mitchell, J.B., McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Floyd, Z.E., Kloster, A., Di Halvorsen, Y., Storms, R.W., Goh, B., Kilroy, G., Wu, X. i Gimble, J.M., 2006. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 24(2), ss.376–385.

Mitchell, K.E., Weiss, M.L., Mitchell, B.M., Martin, P., Davis, D., Morales, L., Helwig, B., Beerenstrauch, M., Abou-Easa, K., Hildreth, T., Troyer, D. i Medicetty, S., 2003. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 21(1), ss.50–60.

Mydel, P., Shipley, J.M., Adair-Kirk, T.L., Kelley, D.G., Broekelmann, T.J., Mecham, R.P. i Senior, R.M., 2008. Neutrophil elastase cleaves laminin-332 (laminin-5) generating peptides that are chemotactic for neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(15), ss.9513–9522.

Nagai, A., Kim, W.K., Lee, H.J., Jeong, H.S., Kim, K.S., Hong, S.H., Park, I.H. i Kim, S.U., 2007. Multilineage potential of stable human mesenchymal stem cell line derived from fetal marrow. *PLoS One*, 2(12), s.e1272.

Naganuma, Y., 1990. Changes of the cerebral microvascular structure and endothelium during the course of permanent ischemia. *The Keio Journal of Medicine*, 39(1), ss.26–31.

Naghdi, M., Tiraihi, T., Namin, S.A.M. i Arabkheradmand, J., 2009. Transdifferentiation of bone marrow stromal cells into cholinergic neuronal phenotype: a potential source for cell therapy in spinal cord injury. *Cytotherapy*, 11(2), ss.137–152.

- Narantuya, D., Nagai, A., Sheikh, A.M., Masuda, J., Kobayashi, S., Yamaguchi, S. i Kim, S.U., 2010. Human microglia transplanted in rat focal ischemia brain induce neuroprotection and behavioral improvement. *PLoS One*, 5(7), s.e11746.
- Niezgoda, A., Niezgoda, P., Nowowiejska, L., Białecka, A., Męcińska-Jundziłł, K., Adamska, U. i Czajkowski, R., 2017. Properties of skin stem cells and their potential clinical applications in modern dermatology. *European journal of dermatology: EJD*.
- Nishijima, T., Piriz, J., Dufloy, S., Fernandez, A.M., Gaitan, G., Gomez-Pinedo, U., Verdugo, J.M.G., Leroy, F., Soya, H., Nuñez, A. i Torres-Aleman, I., 2010. Neuronal activity drives localized blood-brain-barrier transport of serum insulin-like growth factor-I into the CNS. *Neuron*, 67(5), ss.834–846.
- Noh, M.Y., Lim, S.M., Oh, K.-W., Cho, K.-A., Park, J., Kim, K.-S., Lee, S.-J., Kwon, M.-S. i Kim, S.H., 2016. Mesenchymal Stem Cells Modulate the Functional Properties of Microglia via TGF- β Secretion. *Stem Cells Translational Medicine*, 5(11), ss.1538–1549.
- Obtulowicz, P., Lech, W., Strojek, L., Sarnowska, A. i Domanska-Janik, K., 2016. Induction of Endothelial Phenotype From Wharton's Jelly-Derived MSCs and Comparison of Their Vasoprotective and Neuroprotective Potential With Primary WJ-MSCs in CA1 Hippocampal Region Ex Vivo. *Cell Transplantation*, 25(4), ss.715–727.
- Ogura, F., Wakao, S., Kuroda, Y., Tsuchiyama, K., Bagheri, M., Heneidi, S., Chazenbalk, G., Aiba, S. i Dezawa, M., 2014. Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with nontumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. *Stem Cells and Development*, 23(7), ss.717–728.
- Okamura, L.H., Cordero, P., Palomino, J., Parraguez, V.H., Torres, C.G. i Peralta, O.A., 2017. Myogenic Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells Derived from Fetal Bovine Bone Marrow. *Animal Biotechnology*, ss.1–11.
- Okolicsanyi, R.K., Griffiths, L.R. i Haupt, L.M., 2014. Mesenchymal stem cells, neural lineage potential, heparan sulfate proteoglycans and the matrix. *Developmental Biology*, 388(1), ss.1–10.
- Okumura, Y., Sakaki, T., Hiramatsu, K., Tominaga, M. i Yabuno, T., 1997. Microvascular changes associated with postischaemic hypoperfusion in rats. *Acta Neurochirurgica*, 139(7), ss.670-676; discussion 676-677.
- Osada, T., Gu, Y.-H., Kanazawa, M., Tsubota, Y., Hawkins, B.T., Spatz, M., Milner, R. i del Zoppo, G.J., 2011. Interendothelial claudin-5 expression depends on cerebral endothelial cell-matrix adhesion by $\beta(1)$ -integrins. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 31(10), ss.1972–1985.
- Oswald, J., Boxberger, S., Jørgensen, B., Feldmann, S., Ehninger, G., Bornhäuser, M. i Werner, C., 2004. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 22(3), ss.377–384.
- Park, J.W., Ku, S.H., Moon, H.-H., Lee, M., Choi, D., Yang, J., Huh, Y.-M., Jeong, J.H., Park, T.G., Mok, H. i Kim, S.H., 2014a. Cross-linked iron oxide nanoparticles for therapeutic engineering and in vivo monitoring of mesenchymal stem cells in cerebral ischemia model. *Macromolecular Bioscience*, 14(3), ss.380–389.
- Park, K.J., Park, E., Liu, E. i Baker, A.J., 2014b. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells protect postischemic axons after traumatic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 34(2), ss.357–366.
- Pavlova, G., Lopatina, T., Kalinina, N., Rybalkina, E., Parfyonova, Y., Tkachuk, V. i Revishchin, A., 2012. In vitro neuronal induction of adipose-derived stem cells and their fate after transplantation into injured mouse brain. *Current Medicinal Chemistry*, 19(30), ss.5170–5177.

Pérez-Silos, V., Camacho-Morales, A. i Fuentes-Mera, L., 2016. Mesenchymal Stem Cells Subpopulations: Application for Orthopedic Regenerative Medicine. *Stem Cells International*, [online] 2016. Dostępne na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5048051/>> [ostatni dostęp 9.05.2017].

Perígolo-Vicente, R., Ritt, K., Gonçalves-de-Albuquerque, C.F., Castro-Faria-Neto, H.C., Paes-de-Carvalho, R. i Giestal-de-Araujo, E., 2014. IL-6, A1 and A2aR: A crosstalk that modulates BDNF and induces neuroprotection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 449(4), ss.477–482.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. i Marshak, D.R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5411), ss.143–147.

Platel, J.-C., Dave, K.A., Gordon, V., Lacar, B., Rubio, M.E. i Bordey, A., 2010. NMDA receptors activated by subventricular zone astrocytic glutamate are critical for neuroblast survival prior to entering a synaptic network. *Neuron*, 65(6), ss.859–872.

Portalska, K.J., Leferink, A., Groen, N., Fernandes, H., Moroni, L., Blitterswijk, C. van i Boer, J. de, 2012. Endothelial Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells. *PLOS ONE*, 7(10), s.e46842.

Prasad Chennazhy, K. i Krishnan, L.K., 2005. Effect of passage number and matrix characteristics on differentiation of endothelial cells cultured for tissue engineering. *Biomaterials*, 26(28), ss.5658–5667.

Prasad, K., Sharma, A., Garg, A., Mohanty, S., Bhatnagar, S., Johri, S., Singh, K.K., Nair, V., Sarkar, R.S., Gorthi, S.P., Hassan, K.M., Prabhakar, S., Marwaha, N., Khandelwal, N., Misra, U.K., Kalita, J., Nityanand, S. i InveST Study Group, 2014. Intravenous autologous bone marrow mononuclear stem cell therapy for ischemic stroke: a multicentric, randomized trial. *Stroke*, 45(12), ss.3618–3624.

Qiu, J., Li, W., Feng, S., Wang, M. i He, Z., 2013. Transplantation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells attenuates cerebral ischemia and reperfusion injury by inhibiting neuronal apoptosis, oxidative stress and nuclear factor- κ B expression. *International Journal of Molecular Medicine*, 31(1), ss.91–98.

Qu, Y., Wu, J., Chen, D., Zhao, F., Liu, J., Yang, C., Wei, D., Ferriero, D.M. i Mu, D., 2014. MiR-139-5p inhibits HGTD-P and regulates neuronal apoptosis induced by hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Neurobiology of Disease*, 63, ss.184–193.

Raicevic, G., Najar, M., Stamatopoulos, B., De Bruyn, C., Meuleman, N., Bron, D., Toungouz, M. i Lagneaux, L., 2011. The source of human mesenchymal stromal cells influences their TLR profile as well as their functional properties. *Cellular Immunology*, 270(2), ss.207–216.

Riekstina, U., Muceniece, R., Cakstina, I., Muiznieks, I. i Ancans, J., 2008. Characterization of human skin-derived mesenchymal stem cell proliferation rate in different growth conditions. *Cytotechnology*, 58(3), ss.153–162.

Ritfeld, G. i Oudega, M., 2014. Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell Transplant Survival in the Injured Rodent Spinal Cord. *Journal of Bone Marrow Research*. [online] Dostępne na: <<http://www.esciencecentral.org/journals/bone-marrowderived-mesenchymal-stem-cell-transplant-survival-in-the-injured-rodent-spinal-cord-2329-8820.1000146.php?aid=32086>> [ostatni dostęp 26.01.2017].

Rohban, R., Etchart, N. i Pieber, T., 2016. Vasculogenesis Potential of Mesenchymal and Endothelial Stem Cells Isolated from Various Human Tissues. *bioRxiv*, s.049668.

Rooney, G.E., Howard, L., O'Brien, T., Windebank, A.J. i Barry, F.P., 2009. Elevation of cAMP in mesenchymal stem cells transiently upregulates neural markers rather than inducing neural differentiation. *Stem Cells and Development*, 18(3), ss.387–398.

- Rosa, A.I., Gonçalves, J., Cortes, L., Bernardino, L., Malva, J.O. i Agasse, F., 2010. The angiogenic factor angiopoietin-1 is a proneurogenic peptide on subventricular zone stem/progenitor cells. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 30(13), ss.4573–4584.
- Rosová, I., Dao, M., Capoccia, B., Link, D. i Nolta, J.A., 2008. Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26(8), ss.2173–2182.
- Safford, K.M., Hicok, K.C., Safford, S.D., Halvorsen, Y.-D.C., Wilkison, W.O., Gimble, J.M. i Rice, H.E., 2002. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(2), ss.371–379.
- Saha, B., Peron, S., Murray, K., Jaber, M. i Gaillard, A., 2013. Cortical lesion stimulates adult subventricular zone neural progenitor cell proliferation and migration to the site of injury. *Stem Cell Research*, 11(3), ss.965–977.
- Sarnowska, A., 2002. Application of organotypic hippocampal culture for study of selective neuronal death. *Folia Neuropathologica*, 40(2), ss.101–106.
- Sarnowska, A., Jurga, M., Buzańska, L., Filipkowski, R.K., Duniec, K. i Domańska-Janik, K., 2009. Bilateral interaction between cord blood-derived human neural stem cells and organotypic rat hippocampal culture. *Stem Cells and Development*, 18(8), ss.1191–1200.
- Sawada, M., Matsumoto, M. i Sawamoto, K., 2014. Vascular regulation of adult neurogenesis under physiological and pathological conditions. *Frontiers in Neuroscience*, [online] 8. Dostępne na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3955849/>> [ostatni dostęp 3.03.2016].
- Sawada, M. i Sawamoto, K., 2013. Mechanisms of neurogenesis in the normal and injured adult brain. *The Keio Journal of Medicine*, 62(1), ss.13–28.
- Schäffler, A. i Büchler, C., 2007. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(4), ss.818–827.
- Schüring, A.N., Schulte, N., Kelsch, R., Röpke, A., Kiesel, L. i Götte, M., 2011. Characterization of endometrial mesenchymal stem-like cells obtained by endometrial biopsy during routine diagnostics. *Fertility and Sterility*, 95(1), ss.423–426.
- Segev-Amzaleg, N., Trudler, D. i Frenkel, D., 2013. Preconditioning to mild oxidative stress mediates astroglial neuroprotection in an IL-10-dependent manner. *Brain, Behavior, and Immunity*, 30, ss.176–185.
- Seifrtová, M., Havelek, R., Cmielová, J., Jiroutová, A., Soukup, T., Brůčková, L., Mokrá, J., English, D. i Rezáčová, M., 2012. The response of human ectomesenchymal dental pulp stem cells to cisplatin treatment. *International Endodontic Journal*, 45(5), ss.401–412.
- Seto, S.-W., Chang, D., Jenkins, A., Bensoussan, A. i Kiat, H., 2016. Angiogenesis in Ischemic Stroke and Angiogenic Effects of Chinese Herbal Medicine. *Journal of Clinical Medicine*, [online] 5(6). Dostępne na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4929411/>> [ostatni dostęp 26.04.2017].
- Sharma, S., Yang, B., Xi, X., Grotta, J.C., Aronowski, J. i Savitz, S.I., 2011. IL-10 directly protects cortical neurons by activating PI-3 kinase and STAT-3 pathways. *Brain Research*, 1373, ss.189–194.
- Sharma, V., Ling, T.W., Rewell, S.S., Hare, D.L., Howells, D.W., Kourakis, A. i Wookey, P.J., 2012. A novel population of α -smooth muscle actin-positive cells activated in a rat model of stroke: an analysis of the spatio-temporal distribution in response to ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(11), ss.2055–2065.

- Shen, Q., Goderie, S.K., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., Abramova, N., Vincent, P., Pumiglia, K. i Temple, S., 2004. Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 304(5675), ss.1338–1340.
- Sheng, H., Wang, Y., Jin, Y., Zhang, Q., Zhang, Y., Wang, L., Shen, B., Yin, S., Liu, W., Cui, L. i Li, N., 2008. A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Research*, 18(8), ss.846–857.
- Shimamura, M., Nakagami, H., Koriyama, H. i Morishita, R., 2013. Gene therapy and cell-based therapies for therapeutic angiogenesis in peripheral artery disease. *BioMed Research International*, 2013, s.186215.
- Sirko, S., Behrendt, G., Johansson, P.A., Tripathi, P., Costa, M., Bek, S., Heinrich, C., Tiedt, S., Colak, D., Dichgans, M., Fischer, I.R., Plesnila, N., Staufienbiel, M., Haass, C., Snappyan, M., Saghatelian, A., Tsai, L.-H., Fischer, A., Grobe, K., Dimou, L. i Götz, M., 2013. Reactive glia in the injured brain acquire stem cell properties in response to sonic hedgehog. [corrected]. *Cell Stem Cell*, 12(4), ss.426–439.
- Sliem, G.S.A., 2014. Thyroid Dysfunction in Acute Ischemic Stroke in Medical Intensive Care Unit in Zagazig University Hospitals. *IJAR*. [online] Dostępne na: <<http://www.publications.zu.edu.eg/Pages/PubShow.aspx?ID=16863&pubID=18>> [ostatni dostęp 23.01.2017].
- Snappyan, M., Lemasson, M., Brill, M.S., Blais, M., Massouh, M., Ninkovic, J., Gravel, C., Berthod, F., Götz, M., Barker, P.A., Parent, A. i Saghatelian, A., 2009. Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(13), ss.4172–4188.
- Sobrino, T., Hurtado, O., Moro, M.A., Rodríguez-Yáñez, M., Castellanos, M., Brea, D., Moldes, O., Blanco, M., Arenillas, J.F., Leira, R., Dávalos, A., Lizasoain, I. i Castillo, J., 2007. The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome. *Stroke*, 38(10), ss.2759–2764.
- Somjen, G.G., 2001. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiological Reviews*, 81(3), ss.1065–1096.
- Sopko, N.A., Turturice, B.A., Becker, M.E., Brown, C.R., Dong, F., Popović, Z.B. i Penn, M.S., 2010. Bone Marrow Support of the Heart in Pressure Overload Is Lost with Aging. *PLOS ONE*, 5(12), s.e15187.
- Staton, C.A., Reed, M.W.R. i Brown, N.J., 2009. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *International Journal of Experimental Pathology*, 90(3), ss.195–221.
- Steinberg, G.K., Kondziolka, D., Wechsler, L.R., Lunsford, L.D., Coburn, M.L., Billigen, J.B., Kim, A.S., Johnson, J.N., Bates, D., King, B., Case, C., McGrogan, M., Yankee, E.W. i Schwartz, N.E., 2016. Clinical Outcomes of Transplanted Modified Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Stroke: A Phase 1/2a Study. *Stroke*, 47(7), ss.1817–1824.
- Stoll, G., Kleinschnitz, C. i Nieswandt, B., 2008. Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: novel insights and targets for treatment. *Blood*, 112(9), ss.3555–3562.
- Strosznajder, J.B., 2005. Czynniki biochemiczne inicjujące niedokrwienie. W: J.B. Strosznajder i Z. Czernicki, red., *Mózg a niedokrwienie*. Kraków: PLATAN, ss. 7–15.
- Suarez, S. i Ballmer-Hofer, K., 2001. VEGF transiently disrupts gap junctional communication in endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 6), ss.1229–1235.
- Sun, J., Tao, S., Liu, L., Guo, D., Xia, Z. i Huang, M., 2016. miR-140-5p regulates angiogenesis following ischemic stroke by targeting VEGFA. *Molecular Medicine Reports*, 13(5), ss.4499–4505.

- Sun, Y., Jin, K., Childs, J.T., Xie, L., Mao, X.O. i Greenberg, D.A., 2006. Vascular endothelial growth factor-B (VEGFB) stimulates neurogenesis: evidence from knockout mice and growth factor administration. *Developmental Biology*, 289(2), ss.329–335.
- Sun, Y., Jin, K., Xie, L., Childs, J., Mao, X.O., Logvinova, A. i Greenberg, D.A., 2003. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(12), ss.1843–1851.
- Sung, I.-Y., Son, H.-N., Ullah, I., Bharti, D., Park, J.-M., Cho, Y.-C., Byun, J.-H., Kang, Y.-H., Sung, S.-J., Kim, J.-W., Rho, G.-J. i Park, B.-W., 2016. Cardiomyogenic Differentiation of Human Dental Follicle-derived Stem Cells by Suberoylanilide Hydroxamic Acid and Their In Vivo Homing Property. *International Journal of Medical Sciences*, 13(11), ss.841–852.
- Szala, S., Wiśniewska, E. i Czapla, J., 2014. Mezenchymalne komórki zrębu. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 68, ss.1287–1298.
- Tagawa, S., Nakanishi, C., Mori, M., Yoshimuta, T., Yoshida, S., Shimojima, M., Yokawa, J., Kawashiri, M., Yamagishi, M. i Hayashi, K., 2015. Determination of Early and Late Endothelial Progenitor Cells in Peripheral Circulation and Their Clinical Association with Coronary Artery Disease. *International Journal of Vascular Medicine*, [online] 2015. Dostępne na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4588339/>> [ostatni dostęp 13.05.2017].
- Tajiri, N., Kaneko, Y., Shinozuka, K., Ishikawa, H., Yankee, E., McGrogan, M., Case, C. i Borlongan, C.V., 2013. Stem cell recruitment of newly formed host cells via a successful seduction? Filling the gap between neurogenic niche and injured brain site. *PloS One*, 8(9), s.e74857.
- Talwar, T. i Srivastava, M.V.P., 2014. Role of vascular endothelial growth factor and other growth factors in post-stroke recovery. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 17(1), ss.1–6.
- Tanna, T. i Sachan, V., 2014. Mesenchymal stem cells: potential in treatment of neurodegenerative diseases. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 9(6), ss.513–521.
- Tao, H., Han, Z., Han, Z.C. i Li, Z., 2016. Proangiogenic Features of Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Applications. *Stem Cells International*, 2016, s.e1314709.
- Taran, R., Mamidi, M.K., Singh, G., Dutta, S., Parhar, I.S., John, J.P., Bhonde, R., Pal, R. i Das, A.K., 2014. In vitro and in vivo neurogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from different sources. *Journal of Biosciences*, 39(1), ss.157–169.
- Tedgui, A. i Mallat, Z., 2001. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circulation Research*, 88(9), ss.877–887.
- Thau-Zuchman, O., Shohami, E., Alexandrovich, A.G. i Leker, R.R., 2010. Vascular endothelial growth factor increases neurogenesis after traumatic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 30(5), ss.1008–1016.
- Thompson, H.L., Thomas, L. i Metcalfe, D.D., 1993. Murine mast cells attach to and migrate on laminin-, fibronectin-, and matrigel-coated surfaces in response to Fc epsilon RI-mediated signals. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 23(4), ss.270–275.
- Thornton, P., Pinteaux, E., Allan, S.M. i Rothwell, N.J., 2008. Matrix metalloproteinase-9 and urokinase plasminogen activator mediate interleukin-1-induced neurotoxicity. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 37(1), ss.135–142.

Tondreau, T., Lagneaux, L., Dejeneffe, M., Massy, M., Mortier, C., Delforge, A. i Bron, D., 2004. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 72(7), ss.319–326.

Toya, S.P., Wary, K.K., Mittal, M., Li, F., Toth, P.T., Park, C., Rehman, J. i Malik, A.B., 2015. Integrin $\alpha 6\beta 1$ Expressed in ESCs Instructs the Differentiation to Endothelial Cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 33(6), ss.1719–1729.

Tyndall, A., 2011. Successes and failures of stem cell transplantation in autoimmune diseases. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, 2011, ss.280–284.

Ullah, I., Subbarao, R.B. i Rho, G.J., 2015. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, [online] 35(2). Dostępne na: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4413017/>> [ostatni dostęp 14.04.2017].

Ullah, M., Stich, S., Notter, M., Eucker, J., Sittinger, M. i Ringe, J., 2013. 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; Research in Biological Diversity*, 85(3), ss.78–90.

Urbich, C., Aicher, A., Heeschen, C., Dernbach, E., Hofmann, W.K., Zeiher, A.M. i Dimmeler, S., 2005. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 39(5), ss.733–742.

Van, P.P., 2011. Stem Cell Therapy for Islet Regeneration. [online] Dostępne na: <<http://www.intechopen.com/books/stem-cells-in-clinic-and-research/stem-cell-therapy-for-islet-regeneration>> [ostatni dostęp 26.01.2017].

Veeravalli, K.K., Dasari, V.R., Tsung, A.J., Dinh, D.H., Gujrati, M., Fassett, D. i Rao, J.S., 2009. Human umbilical cord blood stem cells upregulate matrix metalloproteinase-2 in rats after spinal cord injury. *Neurobiology of Disease*, 36(1), ss.200–212.

van Velthoven, C.T.J., Kavelaars, A., van Bel, F. i Heijnen, C.J., 2011. Mesenchymal stem cell transplantation changes the gene expression profile of the neonatal ischemic brain. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(7), ss.1342–1348.

van Velthoven, C.T.J., Kavelaars, A. i Heijnen, C.J., 2012. Mesenchymal stem cells as a treatment for neonatal ischemic brain damage. *Pediatric Research*, 71(4–2), ss.474–481.

van Velthoven, C.T.J., Sheldon, R.A., Kavelaars, A., Derugin, N., Vexler, Z.S., Willemsen, H.L.D.M., Maas, M., Heijnen, C.J. i Ferriero, D.M., 2013. Mesenchymal stem cell transplantation attenuates brain injury after neonatal stroke. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 44(5), ss.1426–1432.

Vidale, S., Consoli, A., Arnaboldi, M. i Consoli, D., 2017. Postischemic Inflammation in Acute Stroke. *Journal of Clinical Neurology (Seoul, Korea)*, 13(1), ss.1–9.

Voulgari-Kokota, A., Fairless, R., Karamita, M., Kyrargyri, V., Tseveleki, V., Evangelidou, M., Delorme, B., Charbord, P., Diem, R. i Probert, L., 2012. Mesenchymal stem cells protect CNS neurons against glutamate excitotoxicity by inhibiting glutamate receptor expression and function. *Experimental Neurology*, 236(1), ss.161–170.

Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W. i Ho, A.D., 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental Hematology*, 33(11), ss.1402–1416.

- Waterman, R.S., Tomchuck, S.L., Henkle, S.L. i Betancourt, A.M., 2010. A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. *PLOS ONE*, 5(4), s.e10088.
- Watt, S.M., Gullo, F., van der Garde, M., Markeson, D., Camicia, R., Khoo, C.P. i Zwaginga, J.J., 2013. The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential. *British Medical Bulletin*, 108(1), ss.25–53.
- Wei, L., Erinjeri, J.P., Rovainen, C.M. i Woolsey, T.A., 2001. Collateral Growth and Angiogenesis Around Cortical Stroke. *Stroke*, 32(9), ss.2179–2184.
- Wei, Z.Z., Gu, X., Ferdinand, A., Lee, J.H., Ji, X., Ji, X.M., Yu, S.P. i Wei, L., 2015. Intranasal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells improved neurovascular regeneration and rescued neuropsychiatric deficits after neonatal stroke in rats. *Cell Transplantation*, 24(3), ss.391–402.
- Weiss, M.L., Mitchell, K.E., Hix, J.E., Medicetty, S., El-Zarkouny, S.Z., Grieger, D. i Troyer, D.L., 2003. Transplantation of porcine umbilical cord matrix cells into the rat brain. *Experimental Neurology*, 182(2), ss.288–299.
- Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J. i Black, I.B., 2000. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 61(4), ss.364–370.
- Xing, C., Hayakawa, K., Lok, J., Arai, K. i Lo, E.H., 2012. Injury and repair in the neurovascular unit. *Neurological research*, 34(4), ss.325–330.
- Xue, F., Wu, E., Zhang, P., Li-ya, A., Kou, Y., Yin, X. i Han, N., 2015. Biodegradable chitin conduit tubulation combined with bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for treatment of spinal cord injury by reducing glial scar and cavity formation. *Neural Regeneration Research*, 10(1), ss.104–111.
- Yan, K., Zhang, R., Sun, C., Chen, L., Li, P., Liu, Y., Peng, L., Sun, H., Qin, K., Chen, F., Huang, W., Chen, Y., Lv, B., Du, M., Zou, Y., Cai, Y., Qin, L., Tang, Y. i Jiang, X., 2013. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Maintain the Resting Phenotype of Microglia and Inhibit Microglial Activation. *PLOS ONE*, 8(12), s.e84116.
- Yan, Y.-P., Sailor, K.A., Lang, B.T., Park, S.-W., Vemuganti, R. i Dempsey, R.J., 2007. Monocyte chemoattractant protein-1 plays a critical role in neuroblast migration after focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(6), ss.1213–1224.
- Yang, J.-X., Zhang, N., Wang, H.-W., Gao, P., Yang, Q.-P. i Wen, Q.-P., 2015. CXCR4 Receptor Overexpression in Mesenchymal Stem Cells Facilitates Treatment of Acute Lung Injury in Rats. *Journal of Biological Chemistry*, 290(4), ss.1994–2006.
- Yang, M., Wei, X., Li, J., Heine, L.A., Rosenwasser, R. i Iacovitti, L., 2010a. Changes in Host Blood Factors and Brain Glia Accompanying the Functional Recovery After Systemic Administration of Bone Marrow Stem Cells in Ischemic Stroke Rats. *Cell Transplantation*, 19(9), ss.1073–1084.
- Yang, Z., von Ballmoos, M.W., Faessler, D., Voelzmann, J., Ortmann, J., Diehm, N., Kalka-Moll, W., Baumgartner, I., Di Santo, S. i Kalka, C., 2010b. Paracrine factors secreted by endothelial progenitor cells prevent oxidative stress-induced apoptosis of mature endothelial cells. *Atherosclerosis*, 211(1), ss.103–109.
- Yin, K.-J., Hamblin, M. i Chen, Y.E., 2015. Angiogenesis-regulating microRNAs and Ischemic Stroke. *Current Vascular Pharmacology*, 13(3), ss.352–365.
- Yoo, E.-S., Ahn, J.-Y., Bae, Y.-K., Lee, S.-E., Lee, S. min, Mun, Y.-C., Lee, K.-E. i Seong, C.-M., 2005. Characterization of 'Early' vs 'Late' Endothelial Progenitor Cells (EPCs) Which Are Derived from Human Umbilical Cord Blood (HCB) during *Ex Vivo* Expansion. *Blood*, 106(11), ss.1706–1706.

Yoo, S.-W., Chang, D.-Y., Lee, H.-S., Kim, G.-H., Park, J.-S., Ryu, B.-Y., Joe, E.-H., Lee, Y.-D., Kim, S.-S. i Suh-Kim, H., 2013. Immune following suppression mesenchymal stem cell transplantation in the ischemic brain is mediated by TGF- β . *Neurobiology of Disease*, 58, ss.249–257.

Yu, X., Chen, D., Zhang, Y., Wu, X., Huang, Z., Zhou, H., Zhang, Y. i Zhang, Z., 2012. Overexpression of CXCR4 in mesenchymal stem cells promotes migration, neuroprotection and angiogenesis in a rat model of stroke. *Journal of the Neurological Sciences*, 316(1–2), ss.141–149.

Zacharek, A., Chen, J., Cui, X., Li, A., Li, Y., Roberts, C., Feng, Y., Gao, Q. i Chopp, M., 2007. Angiopoietin1/Tie2 and VEGF/FIk1 induced by MSC treatment amplifies angiogenesis and vascular stabilization after stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 27(10), ss.1684–1691.

Zhang, C., Li, Y., Chen, J., Gao, Q., Zacharek, A., Kapke, A. i Chopp, M., 2006a. Bone marrow stromal cells upregulate expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4, gap junction protein connexin-43 and synaptophysin after stroke in rats. *Neuroscience*, 141(2), ss.687–695.

Zhang, P., Moudgill, N., Hager, E., Tarola, N., DiMatteo, C., McIlhenny, S., Tulenko, T. i DiMuzio, P.J., 2011. Endothelial Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells from Elderly Patients with Cardiovascular Disease. *Stem Cells and Development*, 20(6), ss.977–988.

Zhang, X., Yang, M., Lin, L., Chen, P., Ma, K.T., Zhou, C.Y. i Ao, Y.F., 2006b. Runx2 overexpression enhances osteoblastic differentiation and mineralization in adipose--derived stem cells in vitro and in vivo. *Calcified Tissue International*, 79(3), ss.169–178.

Zhang, Y., Zheng, J., Zhou, Z., Zhou, H., Wang, Y., Gong, Z. i Zhu, J., 2015. Fractalkine promotes chemotaxis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells towards ischemic brain lesions through Jak2 signaling and cytoskeletal reorganization. *The FEBS journal*, 282(5), ss.891–903.

Zhang, Z.G., Zhang, L., Jiang, Q., Zhang, R., Davies, K., Powers, C., Bruggen, N. v i Chopp, M., 2000. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(7), ss.829–838.

Zhao, B.-Q., Wang, S., Kim, H.-Y., Storrie, H., Rosen, B.R., Mooney, D.J., Wang, X. i Lo, E.H., 2006. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nature Medicine*, 12(4), ss.441–445.

Zhou, M., Liu, Z., Liu, C., Jiang, X., Wei, Z., Qiao, W., Ran, F., Wang, W., Qiao, T. i Liu, C., 2012. Tissue engineering of small-diameter vascular grafts by endothelial progenitor cells seeding heparin-coated decellularized scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 100(1), ss.111–120.

Zhu, H., Yoshimoto, T., Imajo-Ohmi, S., Dazortsava, M., Mathivanan, A. i Yamashima, T., 2012. Why are hippocampal CA1 neurons vulnerable but motor cortex neurons resistant to transient ischemia? *Journal of Neurochemistry*, 120(4), ss.574–585.

Zhu, Y., Wang, Y., Zhao, B., Niu, X., Hu, B., Li, Q., Zhang, J., Ding, J., Chen, Y. i Wang, Y., 2017. Comparison of exosomes secreted by induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells and synovial membrane-derived mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), s.64.

Ziemka-Naęecz, M., Zalewska, T., Zajac, H. i Domańska-Janik, K., 2003. Decrease of PKC precedes other cellular signs of calpain activation in area CA1 of the hippocampus after transient cerebral ischemia. *Neurochemistry International*, 42(3), ss.205–214.

del Zoppo, G.J., 2008. Virchow's Triad: The Vascular Basis of Cerebral Injury. *Reviews in neurological diseases*, 5(Suppl 1), ss.S12–S21.

del Zoppo, G.J., 2010. The neurovascular unit in the setting of stroke. *Journal of internal medicine*, 267(2), ss.156–171.

del Zoppo, G.J. del, 2009. Inflammation and the Neurovascular Unit in the Setting of Focal Cerebral Ischemia. *Neuroscience*, 158(3), ss.972–982.

del Zoppo, G.J. i Hamann, G.F., 2011. 2 - The Cerebral Microvasculature and Responses to Ischemia. W: J.P. Mohr, P.A. Wolf, J.C. Grotta, M.A. Moskowitz, M.R. Mayberg i R. von Kummer, red., *Stroke (Fifth Edition)*. [online] Saint Louis: W.B. Saunders, ss. 16–28. Dostępne na: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781416054788100028>> [ostatni dostęp 12.04.2017].

del Zoppo, G.J., Moskowitz, M. i Nedergaard, M., 2016. 7 - The Neurovascular Unit and Responses to Ischemia A2 - Wong, James C. GrottaGregory W. AlbersJoseph P. BroderickScott E. KasnerEng H. LoA. David MendelowRalph L. SaccoLawrence K.S. W: *Stroke (Sixth Edition)*. [online] London: Elsevier, ss. 90–101. Dostępne na: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323295444000074>> [ostatni dostęp 25.01.2016].

Zozulya, A., Weidenfeller, C. i Galla, H.-J., 2008. Pericyte-endothelial cell interaction increases MMP-9 secretion at the blood-brain barrier in vitro. *Brain Research*, 1189, ss.1–11.