

WIOLETTA LECH

Ocena właściwości neuroprotektoryjnych
i regeneracyjnych komórek WJ-MSC w warunkach
kontrolnych i modelach uszkodzenia OUN
in vitro, ex vivo i in vivo

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

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. n. med. Leonory Bużańskiej

Promotor pomocniczy – **dr n. med. Marzena Zychowicz**



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. Mirosława Mossakowskiego PAN

Warszawa 2022

Bardzo dziękuję Pani prof. dr hab. n. med. Leonorze Bużańskiej za opiekę merytoryczną, przekazaną wiedzę, okazaną pomoc oraz wyrozumiałość i cierpliwość.

Dziękuję ś.p. Pani prof. dr hab. n. med. Krystynie Domańskiej-Janik za możliwość rozpoczęcia wspaniałej przygody w świecie komórek macierzystych.

Dziękuję również dr n. med. Marzenie Zychowicz oraz dr. hab. n. med. Annie Sarnowskiej – za cenne rady, trafne uwagi, pomoc w realizacji badań i codzienną życzliwość.

Serdecznie dziękuję Koleżankom i Kolegom z Zakładu Bioinżynierii Komórek Macierzystych oraz Platformy Badań Translacyjnych w Zakresie Medycyny Regeneracyjnej za okazane przez lata wsparcie – nie tylko merytoryczne – oraz niezapomnianą atmosferę w pracy :)

Dziękuję dr n. med. Hannie Kozłowskiej oraz mgr Magdalenie Łachwa-From ze Środowiskowego Laboratorium Laserowych Technik Mikroskopowych za pomoc przy analizie immunocytochemicznej.

Dziękuję Pracownikom Środowiskowego Laboratorium Rezonansu Magnetycznego za nieocenioną pomoc podczas badań in vivo.

Wyniki umieszczone w niniejszej rozprawie doktorskiej częściowo opublikowano w pracy:

Lech W, Sarnowska A, Kuczynska Z, Dabrowski F, Figiel-Dabrowska A, Domanska-Janik K, Buzanska L, Zychowicz M. Biomimetic microenvironmental preconditioning enhance neuroprotective properties of human mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly (WJ-MSCs). *Sci Rep.* 2020 Oct 9;10(1):16946. doi: 10.1038/s41598-020-74066-0.

Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej rozprawie doktorskiej były finansowane w ramach projektów naukowo badawczych: grantu STRATEGMED finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju nr 1/234261/2/NCBR/2014, grantu PRELUDIUM finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki nr 2019/35/N/NZ5/03723 oraz ze środków Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-2020 współfinansowanego ze środków EFS nr POWR.03.02.00-00-I028/17-00.



Narodowe Centrum
Badań i Rozwoju

NARODOWE CENTRUM NAUKI



Fundusze
Europejskie
Wiedza Edukacja Rozwój



Rzeczpospolita
Polska



Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Spis treści

Wykaz skrótów	7
Streszczenie	11
Abstract	16
Innowacyjność rozprawy	21
1. Wstęp	22
1.1. Patofizjologia udaru mózgu.....	22
1.2. Modele zwierzęce udaru niedokrwienego	27
1.3. Mezenchymalne komórki macierzyste.....	29
1.4. Nisza komórek macierzystych i warunki biomimetyczne <i>in vitro</i>	34
1.5. Odwzorowanie mikrośrodowiska <i>in vitro</i> – optymalizacja hodowli komórkowej.....	41
1.6. Eksperymentalne strategie terapeutyczne – wykorzystanie komórek macierzystych w leczeniu udaru mózgu	47
2. Hipoteza badawcza	52
3. Cele pracy	53
4. Materiał	55
4.1. Mezenchymalne komórki macierzyste.....	55
4.2. Zwierzęta doświadczalne	55
5. Metody badań	56
5.1. Izolacja mezenchymalnych komórek macierzystych z galarety Whartona sznura pępowinowego.....	56
5.2. Różnicowanie komórek WJ-MSC w linii mezodermalnej.....	57
5.2.1. Adipogeneza.....	57
5.2.2. Osteogeneza	57
5.2.3. Chondrogeneza.....	58
5.3. Przygotowanie hydrożelowych skafoldów/rusztowań	58
5.4. Analiza tworzenia sieci fibrynowej w skafoldach hydrożelowych.....	59
5.5. Test migracji WJ-MSC w warunkach 3D	59
5.6. Analiza degradacji skafoldów.....	60
5.7. Analiza tempa proliferacji WJ-MSC w warunkach 2D i 3D.....	60
5.8. Analiza żywotności WJ-MSC w warunkach 3D	61
5.9. Analiza immunocytochemiczna.....	61

5.10.	Stymulacja komórek WJ-MSC czynnikami prozapalnymi.....	63
5.11.	Hodowla organotypowa skrawków hipokampa szczura.....	64
5.12.	Procedura OGD (ang. <i>Oxygen-Glucose Deprivation</i>) – czasowe pozbawienie tlenu i glukozy imitujące uszkodzenie ischemiczne	65
5.13.	Współhodowla WJ-MSC ze skrawkami hipokampa szczura	66
5.14.	Eksperymentalny model uszkodzenia mózgu	67
5.15.	Transplantacja komórek WJ-MSC do uszkodzonego mózgu szczura.	69
5.16.	Obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego.....	70
5.17.	Analiza wielkości uszkodzenia mózgu szczura	72
5.18.	Pobranie materiału do badań.....	72
5.18.1.	Pobranie płynu mózgowo-rdzeniowego	72
5.18.2.	Pobranie poszczególnych struktur mózgowia.....	73
5.18.3.	Pobranie całego mózgowia	73
5.19.	Izolacja RNA.....	74
5.20.	Reakcja odwrotnej transkrypcji.....	75
5.21.	Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym	76
5.22.	Analiza immunoenzymatyczna	79
5.23.	Analiza immunohistochemiczna miejsca uszkodzenia.....	81
5.24.	Analiza statystyczna	82
5.25.	Etapy badań i grupy badane	82
6.	Wyniki	88
6.1.	Analiza fenotypu komórek WJ-MSC	88
6.2.	Charakterystyka skafoldów hydrożelowych i hodowli komórkowych 3D 89	
6.3.	Analiza tempa proliferacji komórek WJ-MSC w różnych warunkach hodowli <i>in vitro</i>	92
6.4.	Analiza przeżywalności komórek WJ-MSC w skafoldach hydrożelowych 94	
6.5.	Wpływ warunków przestrzennych i tlenowych na różnicowanie neuralne komórek WJ-MSC	96
6.6.	Wpływ warunków mikrośrodowiska na profil ekspresji komórek WJ- MSC 100	
6.6.1.	Analiza poziomu ekspresji cytokin i neurotrofin w komórkach WJ- MSC w zależności od warunków hodowli <i>in vitro</i>	100

6.6.2. Ocena odpowiedzi komórek WJ-MSC na stymulację czynnikami prozapalnymi	103
6.7. Ocena działania neuroprotekcynnego komórek WJ-MSC	110
6.8. Wpływ współhodowli z uszkodzoną tkanką nerwową na ekspresję komórek WJ-MSC	113
6.9. Wpływ komórek WJ-MSC na odpowiedź organizmu biorcy w eksperymentalnym modelu uszkodzenia mózgu	115
6.9.1. Analiza uszkodzenia mózgu szczura oraz dystrybucji komórek WJ-MSC po transplantacji	115
6.9.2. Analiza wielkości uszkodzenia mózgu szczura	120
6.9.3. Analiza immunohistochemiczna lokalizacji znakowanych nanocząstkami tlenku żelaza WJ-MSC w uszkodzonym mózgu szczura.....	122
6.9.4. Analiza ekspresji szczurzych cytokin i neurotrofin na poziomie mRNA w następstwie ogniskowego uszkodzenia mózgu w porównaniu z grupą kontrolną	123
6.9.5. Analiza ekspresji szczurzych cytokin i neurotrofin na poziomie mRNA w następstwie uszkodzenia mózgu oraz po transplantacji WJ-MSC	124
6.9.6. Analiza stężenia szczurzych cytokin i neurotrofin w płynie mózgowo-rdzeniowym w następstwie uszkodzenia mózgu oraz po transplantacji WJ-MSC	142
7. Dyskusja	153
7.1. Zastosowanie warunków biomimetycznych w hodowli <i>in vitro</i> istotnie wpływa na właściwości komórek macierzystych.....	153
7.1.1. Hydrożelowe skafoldy	154
7.1.2. Fizjologiczna normoksja	156
7.1.3. Stymulacja czynnikami prozapalnymi.....	158
7.2. WJ-MSC w hodowli organotypowej <i>ex vivo</i> wykazują działanie neuroprotekcynne na poziomie tkanki (eksperyment „ <i>proof of concept</i> ” nr 1)	161
7.3. Potencjał terapeutyczny WJ-MSC <i>in vivo</i> (przeszczep do uszkodzonego mózgu szczura) zależy od sposobu podania komórek i warunków hodowli przed transplantacją (eksperyment „ <i>proof of concept</i> ” nr 2).....	163
Podsumowanie.....	172
Wnioski	176
Bibliografia.....	177

Wykaz skrótów

ACTB – β -aktyna (ang. *ACTin β*)

AF-MSC – mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z płynu owodniowego (ang. *Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells*)

ANG-1 – angiopoetyna 1 (ang. *Angiopoietin 1*)

ANOVA – analiza wariancji (ang. *Analysis of Variance*)

ATMP – produkt leczniczy terapii zaawansowanej (ang. *Advanced Therapy Medicinal Product*)

AT-MSC – mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej (ang. *Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells*)

ATP – adenozyno-5'-trifosforan (ang. *Adenosine-5'-triphosphate*)

BBB – bariera krew-mózg (ang. *Blood-Brain Barrier*)

BDNF – neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. *Brain Derived Neurotrophic Factor*)

bFGF – podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *basic Fibroblast Growth Factor*)

BM-MSC – mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego (ang. *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*)

CA – róg Amona, warstwa neuronów piramidowych hipokampa (łac. *Cornu Ammonis*)

CD – antygen różnicowania komórkowego (ang. *Cluster of Differentiation*)

CFU – ośrodki tworzące kolonie (ang. *Colony-Forming Units*)

ChAT – acetylotransferaza cholinowa (ang. *Choline Acetyltransferase*)

CJ-MSC – mezenchymalne komórki macierzyste izolowane ze spojówki (ang. *Conjunctiva Mesenchymal Stem Cells*)

CMFDA – fluorescencyjny znacznik komórkowy (ang. *5-ChloroMethyl-Fluorescein-DiAcetate*)

CSF – płyn mózgowo-rdzeniowy (ang. *Cerebrospinal Fluid*)

DCX – doublekortyna (ang. *Doublecortin*)

DIV – dni w hodowli (ang. *Days In Vitro*)

DMEM – pożywka hodowlana (ang. *Dulbecco Modified Eagle's Minimal Essential Medium*)

DP-MSC – mezenchymalne komórki macierzyste izolowane z miazgi zębowej (ang. *Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells*)

DWI – obrazowanie zależne od dyfuzji (ang. *Diffusion Weighted Imaging*)

ECM – macierz zewnątrzkomórkowa (ang. *Extracellular Matrix*)

EGF – naskórkowy czynnik wzrostu (ang. *Epidermal Growth Factor*)

ESC – embrionalne/zarodkowe komórki macierzyste (ang. *Embryonic Stem Cells*)

FB – fibrynogen (ang. *Fibrinogen*)

FBS – płodowa surowica bydlęca (ang. *Fetal Bovine Serum*)

GAPDH – dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerynowego (ang. *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*)

GCSF – czynnik 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*)

GMP – dobra praktyka wytwarzania (ang. *Good Manufacturing Practice*)

GvHD – choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (ang. *Graft-Versus-Host Disease*)

HEPES – bufor do hodowli komórkowej (ang. *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*)

HGF – czynnik wzrostu hepatocytów (ang. *Hepatocyte Growth Factor*)

HIF – czynnik indukowany hipoksją (ang. *Hypoxia-Inducible Factor*)

HLA – ludzkie antygeny leukocytarne (ang. *Human Leukocyte Antigens*)

HUCB-NSC – neuralne komórki macierzyste/progenitorowe pochodzące z krwi pępowinowej (ang. *Umbilical Cord Blood-derived Neural Stem/Progenitor Cells*)

Iba1 – zjonizowana cząsteczka adaptorowa wiążąca wapń 1 (ang. *Ionized calcium-binding adapter molecule 1*)

ICAM-1 – międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna (ang. *Intercellular Adhesion Molecule-1*)

IDO – dioksygenaza 2,3-indoleaminy (ang. *Indoleamine 2,3-dioxygenase*)

IFN γ – interferon gamma

IGF-1 – insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (ang. *Insulin-like Growth Factor 1*)

IL – interleukina (ang. *Interleukin*)

IP – jodek propidyny (ang. *Propidium Iodide*)

iPSC – indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. *induced Pluripotent Stem Cells*)

ISCT – Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej (ang. *International Society for Cellular Therapy*)

LP – lizat płytkowy (ang. *Platelet Lysate*)

LNGFR – receptor czynnika wzrostu nerwów o niskim powinowactwie (ang. *Low-affinity Nerve Growth Factor Receptor*)

MCAO – zamknięcie tętnicy środkowej mózgu (ang. *Middle Cerebral Artery Occlusion*)

MCP-1 – białko chemotaktyczne monocytów 1, inaczej CCL2 (ang. *Monocyte Chemoattractant Protein -1*)

MHC – główny układ zgodności tkankowej (ang. *Major Histocompatibility Complex*)

MIP-1 α – białko zapalne makrofagów (ang. *Macrophage Inflammatory Protein-1 α*)

MMP – metaloproteinaza macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *Matrix Metalloproteinase*)

MRI – obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (ang. *Magnetic Resonance Imaging*)

MSC – mezenchymalne komórki macierzyste (ang. *Mesenchymal Stem Cells*)

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

NFH – neurofilament-H (ang. *Neurofilament-H*)

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

NK – komórki układu odpornościowego (ang. *Natural Killer*)

OCT3/4 – czynnik transkrypcyjny OCT3/4, kluczowy dla pluripotencjalności (ang. *Octamer-Binding Transcription Factor 3/4*)

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*)

OUA – uszkodzenie indukowane ouabainą (ang. *Ouabain*)

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

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*)

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

PFA – paraformaldehyd (ang. *Paraformaldehyde*)

PGE-2 – prostaglandyna E2 (ang. *Prostaglandin E2*)

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

rt-PA – rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu (ang. *recombinant tissue Plasminogen Activator*)

SDF1 – zrębowy czynnik wzrostu (ang. *Stromal Cell-Derived Factor 1*)

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

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

SSEA – antygen komórek nieodróżnionych (ang. *Stage-Specific Embryonic Antigen*)

STC1 – stanniokalcyna 1 (ang. *Stanniocalcin-1*)

SVZ – strefa okołokomorowa (ang. *Subventricular Zone*)

TBI – urazowe uszkodzenie mózgu (ang. *Traumatic Brain Injury*)

TE – czas echa (ang. *Echo Time*)

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

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

TR – czas repetycji (ang. *Repetition Time*)

Tra – antygen powierzchniowy komórek pluripotencjalnych (ang. *Tumor Rejection Antigen*)

TSG-6 – gen indukowany czynnikiem martwicy nowotworów (ang. *Tumor necrosis factor stimulated gene 6*)

VCAM-1 – naczyniowa cząsteczka adhezyjna (ang. *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*)

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

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organisation*)

WJ-EPC – komórki macierzyste pochodzące z galarety Whartona różnicowane w kierunku endotelialnym (ang. *Wharton's Jelly Endothelial Progenitor Cells*)

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

β -Tub III – β -Tubulina III, białko mikrotubularne (ang. *β -Tubulin III*)

Streszczenie

Terapia komórkowa jest gałęzią medycyny regeneracyjnej i dotyczy przeszczepów komórek, w celu odbudowy uszkodzonej tkanki/narządu, kiedy leczenie farmakologiczne i chirurgiczne jest niewystarczające lub nieefektywne. Komórkami stosowanymi w przeszczepach terapeutycznych są zwykle komórki macierzyste, które posiadają potencjał do samoodnowy i wielokierunkowego różnicowania. Jedną z proponowanych eksperymentalnych metod terapii w przypadku uszkodzeń mózgu jest właśnie terapia komórkowa. Uszkodzenia mózgu, w tym udary, są szczególnym wyzwaniem dla medycyny regeneracyjnej ze względu na skomplikowaną i wielowymiarową specyfikę budowy Ośrodkowego Układu Nerwowego (OUN). W tej pracy wybrano udar mózgu jako model uszkodzenia OUN do badań nad kompetencją terapeutyczną komórek macierzystych, a szczególnie wpływu mikrośrodowiska i prekondukcjonowania w fazie przygotowawczej do przeszczepu na ich właściwości proregeneracyjne.

Do badań wybrano Mezenchymalne Komórki Macierzyste (MSC) izolowane z galarety Whartona (WJ-MSC). MSC stanowią wyjątkowo obiecujące źródło komórek dla wykorzystania w medycynie regeneracyjnej ze względu na ich właściwości parakryne oraz immunomodulacyjne, a także swoistą „plastyczność” rozwojową, co umożliwia różnicowanie w warunkach *in vitro* nie tylko w kierunku mezodermalnym, ale również ektodermalnym. Szczególnie dotyczy to komórek izolowanych z tkanek płodu, w tym WJ-MSC, z uwagi na ich wczesną dojrzałość rozwojową. Dodatkowo zaletą WJ-MSC jest brak ekspresji antygenów zgodności tkankowej klasy II (HLA-DR), co sprawia, że są uprzywilejowane immunologicznie i atrakcyjne dla zastosowań w medycynie regeneracyjnej w układzie allogenicznym.

Naturalne, endogenne mikrośrodowisko komórek macierzystych zwane „niszą” decyduje o ich przeżyciu i wzroście oraz umożliwia dalsze różnicowanie. Dlatego ważnym elementem tej pracy było określenie (zoptymalizowanie) biomimetycznego mikrośrodowiska *in vitro*, które będzie spełniało warunki podobne do endogennych: 1) kontrolnych – hodowla WJ-MSC w warunkach 3D w hydrożelu przypominającym składem i właściwościami mechanicznymi tkankę nerwową oraz w warunkach zawartości tlenu (5% O₂) typowych dla niszy komórek macierzystych w mózgu; 2) patologicznych – dodatkowa stymulacja

w warunkach jw. z czynnikami prozapalnymi. Wcześniejsze odpowiednie przygotowanie komórek macierzystych (tzw. prekondycjonowanie) może sprzyjać zwiększeniu potencjału terapeutycznego przeszczepionych komórek w leczeniu uszkodzeń, m.in. ośrodkowego układu nerwowego. W szczególności pomoże ustalić, czy zastosowanie warunków imitujących naturalne mikrośrodowisko niszy komórkowej zwiększa działanie neuroprotekcyjne i immunomodulacyjne przeszczepianych komórek, stymulując tym samym proces endogennej regeneracji tkanki.

Z tego względu, głównym celem niniejszej pracy była ocena właściwości protekcyjnych i regeneracyjnych komórek WJ-MSC hodowanych w różnych warunkach mikrośrodowiska. Określono wpływ stężenia tlenu oraz hodowli trójwymiarowych (3D), stosując w tym celu hydrożelowe skafoldy – z lizatu płytkowego (LP) oraz fibrynogenu (FB).

Praca została podzielona na trzy etapy: badania *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* obejmujące ocenę porównawczą WJ-MSC hodowanych w warunkach 2D i 3D w 21% O₂ i 5% O₂, przy czym hodowle w 5% stężeniu tlenu prowadzone były w systemie zamkniętym zapewniającym stałe warunki w trakcie hodowli i podczas wszelkich manipulacji z komórkami.

W badaniach *in vitro* przeprowadzono szczegółowe porównanie komórek WJ-MSC hodowanych w warunkach 2D i 3D w 21% O₂ lub 5% O₂ obejmujące m.in. analizę tempa proliferacji, przeżywalności, zdolności do różnicowania w kierunku neuralnym oraz zmiany ekspresji neurotrofin, cytokin pro- i przeciwzapalnych.

Badania *ex vivo* polegały na ocenie działania neuroprotekcyjnego komórek WJ-MSC hodowanych w różnych warunkach przestrzennych i tlenowych względem uszkodzonych w modelu OGD skrawków organotypowych hipokampa szczura, poprzez analizę przeżywalności komórek we wrażliwych na OGD strukturach hipokampa. Określono również profil odpowiedzi WJ-MSC na uszkodzoną tkankę nerwową.

Badania *in vivo* dotyczyły odpowiedzi organizmu biorcy na wykonany przeszczep komórek WJ-MSC w modelu udaru mózgu szczura, w zależności od sposobu ich podania (2D vs. 3D) oraz warunków hodowli komórek przed transplantacją (21% O₂ vs. 5% O₂).

W pierwszym etapie badań wykazano, iż zastosowane skafoldy hydrożelowe tworzą strukturę umożliwiającą osadzenie się komórek, ich wysoką przeżywalność oraz migrację poza granice rusztowania. Komórki WJ-MSC zachowują również stabilne, liniowe tempo wzrostu w obu typach zastosowanych rusztowań, podobnie jak w standardowej hodowli 2D. Ponadto, w hodowlach 3D zaobserwowano istotne zmiany w ekspresji na poziomie mRNA badanych markerów (wzrost ekspresji *BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*, *TGF-β1*, *IL-6*, *IL-1β*) po 24 godz., utrzymujące się również w trakcie kilkudniowej hodowli *in vitro* w porównaniu z hodowlą kontrolną 2D, zarówno w warunkach 21% jak i 5% stężenia tlenu. Dodatkowo, w komórkach hodowanych w skafoldach zaobserwowano zwiększoną ekspresję markerów neuralnych (nestyny, β-Tubuliny III, NF-200 i GFAP) na poziomie mRNA oraz białka. Zastosowanie czynników prozapalnych w hodowli *in vitro* miało na celu sprawdzenie odpowiedzi WJ-MSC na warunki mikrośrodowiska zapalnego, jakie występuje w uszkodzonej tkance. W wyniku stymulacji komórek WJ-MSC zaobserwowano, że warunki hodowli 3D wyraźnie zwiększyły odpowiedź komórek WJ-MSC na zastosowanie czynników prozapalnych, co skutkowało zwiększoną ekspresją na poziomie mRNA zarówno czynników troficznych (*BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*), jak i immunomodulacyjnych (*TGF-β1*, *IL-6*, *IL-1β*) w porównaniu do hodowli 2D.

W badaniach *ex vivo* wykorzystano model OGD, polegający na czasowym pozbawieniu tkanki tlenu i glukozy, co imituje uszkodzenie ischemiczne. Po przeprowadzonej współhodowli uszkodzonych skrawków organotypowych hipokampa szczura z komórkami WJ-MSC zaobserwowano, że WJ-MSC hodowane zarówno w warunkach 21% jak i 5% stężenia tlenu wykazują silne działanie neuroprotekcjne. Najsilniejszy efekt zahamowania śmierci neuronów wrażliwych na niedotlenienie zaobserwowano podczas współhodowli z komórkami z 5% tlenu zasiedlającymi skafold fibrynowy. Co ciekawe, w komórkach WJ-MSC zawieszonych w skafoldach i współhodowanych z uszkodzonymi skrawkami hipokampa zaobserwowano również wzrost ekspresji czynników troficznych, m.in. *GDNF*, *VEGF-A* oraz spadek ekspresji cytokin prozapalnych, m.in. *IL-1β*, przy jednoczesnym wzroście ekspresji cytokiny przeciwzapalnej, tj. *TGF-β1*.

Badania *in vitro* oraz *ex vivo* wykazały, iż warunki przestrzenne hodowli 3D oraz 5% O₂ zwiększają działanie neuroprotekcjne komórek WJ-MSC i mogą wpływać na ich potencjalne właściwości regeneracyjne. Z tego powodu dalsze

badania *in vivo* opierały się na ocenie modulacji reakcji zapalnej oraz procesu regeneracji uszkodzonej tkanki z wykorzystaniem eksperymentalnego modelu cytotoksycznego uszkodzenia mózgu szczura. Analiza obejmowała ocenę zdolności komórek do przeżycia i migracji w różnym czasie od ich podania poprzez wykonanie obrazowania mózgu metodą rezonansu magnetycznego. Określono również wpływ przeszczepionych komórek na wielkość powstałego uszkodzenia mózgu, a także przeprowadzono szczegółową ocenę poziomu ekspresji neurotrofin, cytokin pro- i przeciwzapalnych w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz na poziomie mRNA w uszkodzonym mózgu szczura.

Sygnal pochodzący z wyznakowanych nanocząstkami tlenku żelaza komórek WJ-MSC zaobserwowano w miejscu podania (prążkowie) po 24 godz. od transplantacji do mózgu, a także w kolejnych punktach czasowych – 7, 14, 21 dni od przeszczepu. Nie zaobserwowano migracji komórek do innych struktur mózgu, poza prążkowiem, które uległo uszkodzeniu. Dodatkowo, po podaniu komórek w 2D oraz skafoldach zaobserwowano wyraźny sygnał w miejscu lezji podczas obrazowania zależnego od dyfuzji (DWI), którego nie odnotowano w wyniku podania sham, ani w następstwie samego uszkodzenia ogniskowego. Po uszkodzeniu wywołanym ouabainą w porównaniu do kontroli zaobserwowano wzrost ekspresji badanych markerów: *BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*, *TGF- β 1*, *IL-6* oraz *IL-1 β* , szczególnie po 24 godz. od urazu.

W wyniku podania komórek WJ-MSC zaobserwowano zmniejszenie wielkości uszkodzenia mózgu indukowanego iniekcją ouabainy oraz wzrost ekspresji szczurzych markerów: *BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*, *TGF- β 1* w porównaniu do poziomu ekspresji obserwowanego w uszkodzonym prążkowie. Najwyższy wzrost ekspresji analizowanych genów stwierdzono w przypadku podania komórek, które były hodowane w 5% O₂, a następnie przeszczepione w hydrożelowych skafoldach. Podanie komórek WJ-MSC skutkowało również spadkiem ekspresji szczurzych *IL-6* oraz *IL-1 β* , szczególnie po 24 godz. od przeszczepu. Badania te umożliwiły określenie dynamiki zmian, występujących w uszkodzonym mózgu szczura po podaniu materiału terapeutycznego w postaci komórek WJ-MSC prekondycjonowanych w określonych warunkach mikrośrodowiska. Otrzymane wyniki wykazały, że hydrożelowe rusztowania wykonane z lizatu płytkowego i fibrynogenu zastosowane w niniejszej pracy stanowią obiecujący materiał dla potencjalnego wykorzystania w terapii

komórkowej chorób układu nerwowego. Uzyskane wyniki sugerują, że najbardziej korzystne terapeutycznie wydaje się być utrzymywanie komórek w hodowli w warunkach fizjologicznej normoksji (5% O₂), a następnie ich przeszczepienie z wykorzystaniem hydrożelowych rusztowań o właściwościach mechanicznych podobnych do tkanki typowej dla mózgu, które jednocześnie będą chroniły komórki przed reakcją układu odpornościowego biorcy.

Opracowanie skutecznych, efektywnych, powtarzalnych i przede wszystkim bezpiecznych metod pozyskiwania, namnażania i przeszczepiania komórek macierzystych zwiększa szanse na skuteczne wykorzystywanie terapii komórkowej w medycynie regeneracyjnej. W przypadku terapii komórkowej chorób OUN na dzień dzisiejszy brak jest doniesień o pełnej regeneracji uszkodzonej tkanki wraz z odbudową funkcjonalnych obwodów nerwowych. Pozytywny efekt terapeutyczny w prowadzonych próbach klinicznych dotyczy głównie właściwości parakrynych (wydzielniczych) podawanych komórek, a nie na ich zdolności do różnicowania i funkcjonalnej integracji z uszkodzoną tkanką. Przeszczepione komórki poprzez wydzielanie do otaczającego środowiska licznych czynników wzrostowych (m.in. angio- i neurogennych) oraz cytokin przeciwzapalnych, mogą stymulować endogenne komórki i przez to wpływać na remodelowanie tkanki oraz zwiększać podatność układu nerwowego na rehabilitację. Dlatego otrzymane w tej pracy wyniki, które kompleksowo określają i optymalizują warunki prekondycjonowania WJ-MSC w hodowli *in vitro* oraz sposób ich podania w eksperymencie przedklinicznym *in vivo* są cenne dla rozwoju medycyny regeneracyjnej z wykorzystaniem terapii komórkowej.

Abstract

Cell therapy is a branch of regenerative medicine and relates to cell transplantations in order to rebuild damaged tissue/organ when pharmacological and surgical treatment is insufficient or ineffective. Stem cells characterized by potential to self-renew and multilineage differentiation are most commonly used for transplantations in regenerative medicine. Cell therapy is one of the proposed experimental therapies for brain injuries. Stroke is a special challenge for regenerative medicine due to the complex and multidimensional specificity of the Central Nervous System (CNS) structure. For this reason, ischemic stroke was selected as a model of CNS damage to analyze the stem cells' therapeutic competence, especially the influence of the microenvironment and preconditioning in the pre-transplantation phase on their pro-regenerative properties.

For this study, Mesenchymal Stem Cells isolated from Wharton's Jelly (WJ-MSCs) have been chosen. MSCs are an exceptionally promising source for use in regenerative medicine due to their paracrine and immunomodulatory properties, as well as their specific developmental "plasticity", which enables not only mesodermal but also ectodermal differentiation *in vitro*. This particularly refers to the cells isolated from postnatal tissues, including WJ-MSCs, due to their early developmental stage. Additionally, the advantage of the WJ-MSCs is the lack of expression of class II histocompatibility antigens (HLA-DR), which makes them immunologically privileged and attractive for allogeneic regenerative medicine applications.

The natural, endogenous stem cells microenvironment, known as the "niche", determines their survival and growth, and enables further differentiation. Therefore, an important element of this work was to determine (optimize) the biomimetic microenvironment *in vitro*, which mimics the conditions similar to the endogenous: 1) control – WJ-MSCs cultured in 3D conditions in a hydrogels resembling the composition and mechanical properties of nervous tissue and under 5% oxygen concentration, typical of the stem cell niche in the brain; 2) pathological – additional stimulation under the conditions as above with the pro-inflammatory factors. Appropriate stem cell preparation (preconditioning) may contribute to increasing the regenerative potential of the transplanted cells in the treatment of damaged central nervous system. In particular, it will help to determine whether the

application of conditions imitating the natural cell niche microenvironment increases the neuroprotective and immunomodulatory properties of the transplanted cells, thus stimulating the process of endogenous tissue regeneration.

The main goal of this study was to assess the protective and regenerative properties of WJ-MSCs cultured in various microenvironmental conditions by determining the effect of oxygen concentration and three-dimensional (3D) cultures, using hydrogel scaffolds made from platelet lysate (PL) or fibrinogen (FB).

The work had three stages: *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo*, and included comparative evaluation of WJ-MSCs cultured in 2D or 3D in 21% O₂ or 5% O₂, while 5% oxygen cultures were conducted in a closed system ensuring constant conditions during cell culture and any manipulation with cells (passaging, medium exchange).

A detailed comparison of WJ-MSCs cultured in 2D and 3D in 21% O₂ or 5% O₂ was performed during *in vitro* studies and included analysis of the proliferation rate, survival, ability to neural differentiation, and changes in the expression level of neurotrophins, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines.

The *ex vivo* studies assessed the neuroprotective effect of WJ-MSCs cultured under different spatial and aerobic conditions in injured rat hippocampal slices by determining the level of cell death in sensitive to OGD damage hippocampal structures. In addition, the WJ-MSCs response to the damaged nerve tissue was determined.

In vivo studies were focused on the recipients' tissue response to the WJ-MSCs depending on the method of their transplantation (2D vs. 3D) and the cell culture conditions before transplantation (21% O₂ vs. 5% O₂).

In the first step of this research, it was shown that the 3D hydrogel scaffolds create a structure that allows the cells deposition, their high survival, and migration beyond the scaffolds. WJ-MSCs also maintain a stable, linear growth rate in both types of scaffolds, similar to standard 2D culture. Moreover, significant changes in expression at the mRNA level of the tested markers (increased expression of *BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*, *TGF-β1*, *IL-6*, *IL-1β*) were observed after 24 hours in the 3D cultures, which were also indicated during several days of *in vitro* culture, as compared to a 2D control culture under both 21% and 5% oxygen conditions.

Additionally, in WJ-MSCs cultured in 3D scaffolds, an increased expression of neural markers (nestin, β -Tubulin III, NF-200, and GFAP) was observed at the mRNA and protein levels.

After the stimulation with pro-inflammatory cytokines, a significantly increased mRNA expression of trophic factors (*BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*) and immunomodulatory factors (*TGF- β 1*, *IL-6*, *IL-1 β*) was observed. Moreover, the 3D culture conditions significantly increased the response of WJ-MSCs to the pro-inflammatory factors, as compared to 2D culture.

In *ex vivo* studies, the OGD model (temporary oxygen and glucose deprivation) was used, which imitates an ischemic injury. After the co-culture of damaged rat organotypic hippocampal slices with WJ-MSCs cultured under 21% and 5% oxygen conditions, a strong neuroprotective effect has been observed. The strongest effect was observed after the co-culture with WJ-MSCs preincubated in 5% O₂ and fibrin scaffolds. Interestingly, an increased expression of trophic factors (*GDNF*, *VEGF-A*) and a decreased expression of pro-inflammatory cytokine *IL-1 β* with a simultaneous increase in the expression of the anti-inflammatory cytokine *TGF- β 1* was also observed in WJ-MSCs encapsulated in scaffolds and co-cultured with damaged organotypic hippocampal slices.

In vitro and *ex vivo* studies have shown that the 5% O₂ and 3D culture conditions increase the neuroprotective activity of WJ-MSCs and may influence their potential regenerative properties. For this reason, *in vivo* studies were based on the evaluation of the inflammatory response modulation and the damaged tissue regeneration process, using an experimental model of rat brain injury.

The analysis included the assessment of the cells' ability to survive and migrate by performing magnetic resonance imaging of the rat brain at different time points after transplantation. The effect of transplanted cells on the lesion size in the damaged brain was also determined. In addition, a detailed assessment of the expression level of neurotrophins, pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the cerebrospinal fluid, as well as mRNA level in the injured rat brain were assessed. The signal from WJ-MSCs labelled with iron oxide nanoparticles (SPIO) was observed in the injection site (*striatum*) 24 hours after transplantation into the brain, and also 7-, 14-, and 21- days post-transplantation. No cell migration to the other brain structures was observed, except in the *striatum*, which was the damaged structure. In addition, after the WJ-MSCs transplantation in saline (2D)

or scaffolds, a signal was detected at the lesion site during diffusion-weighted imaging (DWI), which was not observed in sham groups or after the focal injury without cell transplantation. After the injury, an increased expression of the analyzed markers: *BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*, *TGF- β 1*, *IL-6*, and *IL-1 β* , especially 24 hours after the injury, in comparison to the control animals was observed.

After the WJ-MSCs transplantation, a decreased size of the brain-damaged area and an increased expression of rat markers: *BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*, and *TGF- β 1* were detected as compared to the expression level observed in the damaged *striatum* without cell transplantation. The highest increase in the expression level of the analyzed genes was observed after transplantation of the cells that were cultured in physiological normoxia conditions (5% O₂) and then transplanted in hydrogel scaffolds. Transplantation of WJ-MSCs caused also the decreased expression of rat *IL-6* and *IL-1 β* , especially after 24 hours.

These studies allow us to determine the dynamics of changes occurring in the injured rat brain after the therapeutic material transplantation, such as WJ-MSCs preconditioned in specific microenvironmental conditions. The obtained results showed that the hydrogel scaffolds made of platelet lysate and fibrinogen used in this study are promising material for potential use in cell therapy of central nervous system disorders. The most preferred therapeutic approach seems to be maintaining of the cells in culture under physiological normoxia (5% O₂) followed by their transplantation as encapsulated in hydrogel scaffolds. These scaffolds should maintain mechanical properties similar to those found in the brain.

The development of efficient, repeatable, and safe methods of obtaining, culturing, and transplantation of stem cells increases possibility of effective use of cell therapy in regenerative medicine. In the case of cell therapy for CNS disorders, there are no reports that prove the successful regeneration of damaged tissue along with the restoration of functional nervous circuits. The positive therapeutic effect in the reported clinical trials concerns mainly the paracrine (secretory) properties of the transplanted cells, and not their ability to differentiate and functionally integrate with the damaged tissue.

Transplanted cells can stimulate endogenous cells by secreting numerous of growth factors with angio- and neurogenic potential, as well as anti-inflammatory cytokines into the surrounding environment, remodelling the tissue and increasing the susceptibility of the nervous system to rehabilitation. Therefore, the results

obtained in this study, which comprehensively define and optimize the settings for preconditioning of WJ-MSCs during *in vitro* culture, as well as optimize the method of their transplantation in preclinical *in vivo* experiments, are valuable for the development of regenerative medicine based on the cell therapy.

Innowacyjność rozprawy

Innowacyjność rozprawy wynika z określenia przydatności zastosowania nowego elementu, jakim jest „prekondycjonowanie” komórek (WJ-MSK) w warunkach biomimetycznych (odzwierciedlających warunki endogenne), w celu zwiększenia ich potencjału terapeutycznego.

Warunki biomimetyczne do prekondycjonowania komórek, które zastosowano w tej pracy polegały na:

- hodowli komórek *in vitro* w warunkach „fizjologicznej normoksji” (poziom tlenu odpowiadający warunkom endogennym *in vivo*) w specjalnej komorze zapewniającej stałe stężenie tlenu (5%) podczas całego eksperymentu (od izolacji komórek, aż do ich transplantacji);

- zastosowaniu hydrożelowych szkieletów wykonanych z białek ludzkiego osocza jako nośników dla komórek WJ-MSK w warunkach 3D, których właściwości mechaniczne są zbliżone do występujących w mózgu.

Analiza reakcji organizmu biorcy na wykonany przeszczep – nie tylko w miejscu uszkodzenia tkanki, ale również w płynie mózgowo-rdzeniowym (wskaźniki stanu zapalnego) – pozwoliła kompleksowo ocenić działanie WJ-MSK w zależności od warunków ich prekondycjonowania.

W niniejszej rozprawie dowiedziono, że dzięki zastosowaniu określonych warunków biomimetycznych do hodowli i późniejszej transplantacji WJ-MSK (stała fizjologiczna normoksja, szkielety hydrożelowe), otrzymano komórki o najkorzystniejszym profilu neuroprotektoryjnym i przeciwzapalnym. Odpowiednie przygotowanie *in vitro* komórek macierzystych przed przeszczepem ma kluczowe znaczenie dla opracowania nowych, skutecznych rozwiązań w medycynie regeneracyjnej. Jest to szczególnie istotne w związku ze zwiększającym się zapotrzebowaniem społecznym leczenia chorób OUN o niskim wskaźniku sukcesu terapeutycznego.

1. Wstęp

1.1. Patofizjologia udaru mózgu

Udar mózgu jest chorobą cywilizacyjną i dotyka około 15 milionów ludzi rocznie na całym świecie. Z tego względu został wybrany w tej pracy jako model uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego do badań nad kompetencją terapeutyczną komórek mezenchymalnych izolowanych z galarety Whartona (WJ-MSC, ang. *Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells*), ze szczególnym zwróceniem uwagi na ich właściwości neuroprotektoryjne i regeneracyjne. Zgodnie z definicją Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organisation*) z 1970 roku, udar mózgu to „nagle wystąpienie ogniskowych lub uogólnionych zaburzeń czynności mózgu, trwających dłużej niż 24 godz. (o ile wcześniej nie doprowadzą do zgonu) i spowodowanych wyłącznie przyczynami naczyniowymi, związanymi z mózgowym przepływem krwi” (<https://ezdrowie.gov.pl/portal/home/zdrowe-dane/raporty/nfz-o-zdrowiu-udar-niedokrwienny-mozgu>). Udar niedokrwienny występuje znacznie częściej (80%) niż udar krwotoczny (20%) i stanowi obecnie jedną z najczęstszych, po chorobach serca i nowotworach, przyczyn śmierci i długotrwałej niepełnosprawności. Większość osób po przebytych udarach cierpi na znaczne deficyty ruchowe i obniżoną jakość życia (Sobolewski 2011; Incontri Abraham i wsp., 2019; Muhammad i wsp., 2021). Dane Narodowego Funduszu Zdrowia z lat 2013-2018 wskazują, iż w Polsce udar mózgu dotyka rocznie około 70 tys. Polaków, z czego 30% nie przeżywa roku. Do czynników ryzyka wystąpienia udaru mózgu należą w szczególności: nadciśnienie tętnicze, otyłość, choroby serca, palenie tytoniu, nieodpowiednia dieta, stres, nadużywanie alkoholu, brak aktywności fizycznej, cukrzyca.

Przyczyną udaru niedokrwiennego może być zator pochodzenia sercowego, niedrożność małych naczyń w mózgu, czy miażdżycy wpływająca na krążenie mózgowe (Maida i wsp., 2020). Kiedy dochodzi do udaru niedokrwiennego, tkanki ulegają hipoperfuzji, co prowadzi do miejscowego niedoboru tlenu i glukozy (Datta i wsp., 2020). Powoduje to wyczerpanie energii i składników odżywczych niezbędnych dla metabolizmu i przeżycia komórek. Prowadzi również do braku równowagi gradientów osmotycznych, wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego jonów wapnia, uszkodzenia integralności błony mitochondrialnej. Ponadto, utrata

funkcji błonowej pompy sodowo-potasowej i zakłócenie bariery krew-mózg skutkuje obrzękiem cytotoksycznym i nasila martwicę i apoptozę w rejonie udaru (Incontri Abraham i wsp., 2019; Datta i wsp., 2020).

Okluzja/niedrożność naczyń krwionośnych powoduje pozbawienie obszarów mózgu tlenu i energii, a następnie powstanie reaktywnych form tlenu, uwolnienie glutaminianu, nagromadzenie jonów wapnia wewnątrz komórki i wywołanie procesów zapalnych. Ta sekwencja zdarzeń, nazywana kaskadą niedokrwienną, prowadzi do nieodwracalnego uszkodzenia tkanki (Fluri i wsp., 2015). Jest to złożona seria procesów neurochemicznych wyzwalanych przez przejściowe lub trwałe ogniskowe niedokrwienie mózgu i obejmuje niewydolność bioenergetyczną komórek, ekscytotoksyczność, stres oksydacyjny, dysfunkcję bariery krew-mózg, uszkodzenie mikrokrążenia, aktywację procesów hemostazy, stan zapalny po niedokrwieniu i ostatecznie śmierć neuronów, komórek glejowych i komórek śródbłonna (Brouns i wsp., 2009).

Pomiędzy bezpośrednio uszkodzonym obszarem mózgu a zdrową tkanką występuje tzw. strefa półcienia (penumbra), czyli obszar upośledzony funkcjonalnie, ale strukturalnie nienaruszony. Penumbra jest obszarem ograniczonego przepływu krwi z częściowo zachowanym metabolizmem energetycznym (Brouns i wsp., 2009). W ognisku niedokrwienia brak ATP, tlenu i glukozy jest nieodwracalny i powoduje natychmiastową śmierć komórek (Datta i wsp., 2020). Uruchomiona kaskada niedokrwienna powoduje dodatkowo dalsze obumieranie komórek i często w ciągu kilku godzin od wystąpienia udaru, ognisko niedokrwienia powiększa się o strefę półcienia, zwiększając w ten sposób obszar dotknięty uszkodzeniem (Brouns i wsp., 2009). Śmierć komórek w penumbrze jest jednak powolna i nie wszystkie giną w tym samym czasie, tak jak w ognisku niedokrwienia. Zmianom w strefie penumbry można zatem zapobiec, poprawiając przepływ krwi i/lub zakłócając kaskadę niedokrwienną, wdrażając odpowiednie leczenie w określonym oknie terapeutycznym (Fluri i wsp., 2015). Ponieważ „ratowanie” tej tkanki skutkuje poprawą neurologiczną i regeneracją, jest to główny cel terapii ostrego udaru mózgu (Brouns i wsp., 2009).

Zdecydowana większość przypadków udaru mózgu jest spowodowana przejściową lub trwałą niedrożnością mózgowego naczynia krwionośnego. Ostateczna wielkość udaru i wynik neurologiczny zależą od wielu czynników, takich jak czas trwania i ciężkość niedokrwienia, istnienie krążenia obocznego

i odpowiednie ciśnienie krwi, etiologia i lokalizacja uszkodzenia, ale także wiek, płeć, choroby współistniejące. Udar niedokrwienny jest zatem bardzo złożonym i niejednorodnym zaburzeniem (Sommer 2017).

Pomimo wielu badań dotyczących strategii terapeutycznych udaru mózgu, wciąż ograniczają się one głównie do trombolizy z użyciem rekombinowanego tkankowego aktywatora plazminogenu (rtPA, ang. *recombinant tissue Plasminogen Activator*) oraz trombektomii wewnątrznaczyniowej. Trombektomia polega na wprowadzeniu cewnika do naczynia mózgowego i usunięciu skrzepliny. W przypadku trombolizy pacjenci otrzymują leki trombolityczne mające na celu rozpuszczenie powstałego w naczyniu skrzepu. Problemem jest jednak bardzo wąskie okno terapeutyczne – około 4,5 godziny od wystąpienia objawów (Muhammad i wsp., 2021), co skutkuje tym, iż niewielu pacjentów jest w stanie otrzymać pomoc w odpowiednim czasie.

Coraz więcej dowodów wskazuje na istotną funkcję, jaką układ immunologiczny odgrywa w patofizjologicznych zmianach zachodzących po uszkodzeniu niedokrwiennym mózgu. W warunkach fizjologicznych transport składników krwi do mózgu jest regulowany przez barierę krew-mózg (BBB, ang. *Blood-Brain Barrier*). W wyniku uszkodzenia mózgu dochodzi do zwiększenia przepuszczalności pomiędzy komórkami śródbłonna BBB, co umożliwia komórkom układu odpornościowego i wydzielanym przez nie cytokinom aktywować odpowiedź zapalną (Tobin i wsp., 2014). Stan zapalny odgrywa ważną rolę w patogenezie udaru niedokrwiennego. Układ odpornościowy zostaje natychmiast aktywowany w odpowiedzi na uszkodzenie neuronów, aktywacja odporności wrodzonej wywołuje stan zapalny, a mediatory prozapalne rekrutują więcej komórek odpornościowych zarówno w ośrodkowym, jak i obwodowym układzie nerwowym (Wang i wsp., 2018).

Komórki glejowe, w tym mikroglej, astrocyty i oligodendrocyty, są głównymi składnikami środowiska okołoniedokrwiennego w ośrodkowym układzie nerwowym i biorą udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej po udarze (Xu i wsp., 2020). W wyniku niedokrwienia dochodzi do aktywacji komórek mikrogleju, wytwarzania mediatorów prozapalnych i nacieku neutrofilii, limfocytów T, makrofagów i innych komórek w miejsce uszkodzonej tkanki (Jin i wsp., 2010). Uszkodzenie następujące po udarze niedokrwiennym powoduje martwicę i apoptozę, co uaktywnia reakcję zapalną kontrolowaną przez

wydzielanie reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *Reactive Oxygen Species*) i cytokin (Maida i wsp., 2020). Cytokiny pełnią kluczową funkcję w procesie aktywacji, różnicowania i proliferacji komórek oraz są głównymi modulatorami układu odpornościowego (Jin i wsp., 2013). Cytokiny regulują odpowiedź immunologiczną i zapalną oraz służą jako biomarkery wielu chorób. Ilościowa ocena cytokin zapewnia wgląd w procesy fizjologiczne i patologiczne i może być wykorzystywana do wspomagania diagnozy i leczenia (Liu i wsp., 2021). Po pojawieniu się stanu zapalnego w mózgu nasila się wydzielanie wielu cytokin zarówno w uszkodzonym mózgu, jak i we krwi obwodowej. Do głównych mediatorów zaangażowanych w odpowiedź na niedokrwienne uszkodzenie mózgu należą cytokiny prozapalne, takie jak czynnik martwicy nowotworu- α (TNF- α , ang. *Tumor Necrosis Factor- α*), interleukina-1 β (IL-1 β), IL-6, białko chemotaktyczne monocytów (MCP-1, ang. *Monocyte Chemoattractant Protein-1*), białko zapalne makrofagów (MIP-1 α , ang. *Macrophage Inflammatory Protein-1 α*) oraz przeciwzapalne: IL-10, transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β 1, ang. *Transforming Growth Factor β 1*), insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-1, ang. *Insulin-like Growth Factor 1*). Wydzielane są przez komórki mikrogleju, makrofagi, astrocyty, neurony i komórki endotelialne w różnym czasie od wystąpienia uszkodzenia i wykazują działanie neurotoksyczne lub neuroprotektoryjne (Jin i wsp., 2013). Aktywowany mikroglej wydziela cytokiny prozapalne, takie jak TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-23 i tlenek azotu, co prowadzi do uszkodzenia tkanek. Ponadto, krążące monocyty są rekrutowane do niedokrwionego mózgu i różnicują się w makrofagi, które również ulegają aktywacji i promują dalsze uszkodzenie tkanek (Hatakeyama i wsp., 2020).

IL-1 β , IL-6 i TNF- α odgrywają kluczową rolę w patogenezie udaru, przykładowo IL-1 β wywiera działanie neurotoksyczne, a blokowanie jej aktywności zmniejsza uszkodzenie mózgu wywołane niedokrwieniem (Clausen i wsp., 2008). IL-1 β może wywoływać szereg odpowiedzi, które mogą zaostrzać lub indukować uszkodzenie i śmierć neuronów (Tuttolomondo i wsp., 2008). IL-1 aktywuje ponadto astrocyty, komórki śródbłonna i metaloproteinazy, sprzyja uwalnianiu chemokin, naczyniowej cząsteczki adhezyjnej (VCAM-1, ang. *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) oraz międzykomórkowej cząsteczki adhezyjnej (ICAM-1, ang. *Intercellular Adhesion Molecule-1*) (Bonaventura i wsp., 2016).

TNF- α pełni różne funkcje pośredniczące w odpowiedzi zapalnej oraz w uszkodzeniu mózgu. Wykazuje działanie zarówno zaostrzające, jak i wyciszające stan zapalny i może działać ochronnie na niedokrwione neurony (Bonaventura i wsp., 2016). Po uszkodzeniu niedokrwinnym, TNF- α zaczynają wydzielać m.in. komórki glejowe i neurony (Murakami i wsp., 2005). Ekspresja TNF- α po udarze stymuluje uwalnianie IL-1, tlenu azotu, czynnika von Willebranda, czynnika aktywującego płytki krwi i endoteliny, redukcję tkankowego aktywatora plazminogenu i uwalnianie inhibitora aktywatora plazminogenu-1 (Tuttolomondo i wsp., 2008).

IL-6 może być indukowana przez różne cząsteczki, w tym IL-1, TNF- α , TGF- β i prostaglandyny oraz wiele innych mediatorów, takich jak β -amyloid, interferon- γ (IFN- γ) i IL-4. Stwierdzono również, że od poziomu TNF- α i IL-6 w osoczu zależą rokowania po udarze niedokrwinnym (Tuttolomondo i wsp., 2008). W stanach fizjologicznych stężenie IL-6 utrzymuje się na niskim poziomie. W wyniku powstałego stanu zapalnego, IL-6 zaczyna być wydzielana głównie przez komórki glejowe. Podwyższony poziom IL-6 może prowadzić nie tylko do zmniejszenia neurogenezy w hipokampie, ale także zwiększenia obecności gleju gwiaździstego (astrogleju, astrocytów), co prowadzi do powiększenia blizny glejowej w miejscu uszkodzenia. Wykazano także, że istnieje korelacja pomiędzy zwiększeniem poziomu IL-6, a wystąpieniem ataków padaczkowych będących częstym powikłaniem po udarze (Jia i wsp., 2020).

Rozwijający się stan zapalny powoduje szereg uszkodzeń i prowadzi do śmierci komórek, ale jednocześnie działa stymulująco na endogenne procesy naprawcze (Maida i wsp., 2020). Udar niedokrwenny indukuje neurogenezę z neuralnych komórek macierzystych/progenitorowych w strefie okołokomorowej (SVZ, ang. *Subventricular Zone*) i migrację nowo utworzonych neuroblastów w kierunku uszkodzonego prążkowie, gdzie różnicują się do dojrzałych neuronów (Chapman i wsp., 2015).

W odpowiedzi na pojawiający się w następstwie udaru mózgu stan zapalny zaangażowane są także różne czynniki troficzne. Czynniki troficzne (czynniki wzrostu), w tym neurotrofiny, takie jak neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF, ang. *Brain Derived Neurotrophic Factor*) oraz neurotroficzny czynnik pochodzenia glejowego (GDNF, ang. *Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor*) biorą udział w przeżyciu i różnicowaniu komórek nerwowych (Kurtzeborn

i wsp., 2018). Pełnią również istotną funkcję w regeneracji mózgu po uszkodzeniu niedokrwiennym. BDNF reguluje regenerację neuronów oraz plastyczność synaptyczną w neuronach w obwodowym i ośrodkowym układzie nerwowym. Zmiany w poziomie ekspresji BDNF, zarówno we krwi obwodowej, jak i w tkankach OUN, związane są z patogenezą chorób neurodegeneracyjnych, w tym udaru niedokrwiennego mózgu (Eyileten i wsp., 2021). Poziom BDNF w ostrej fazie udaru niedokrwiennego mózgu może mieć wartość prognostyczną dla stanu funkcjonalnego pacjenta. Badania wykazały, że niedobór BDNF jest związany z cięższą patofizjologią udaru, ponieważ BDNF odgrywa istotną rolę w promowaniu różnicowania neuronów, przeżycia komórek i neurogenezy (Eyileten i wsp., 2021). GDNF jest wytwarzany przez komórki glejowe oraz neurony i odgrywa ważną rolę w różnicowaniu neuronów podczas rozwoju. Po uszkodzeniu ośrodkowego lub obwodowego układu nerwowego, GDNF sprzyja także przeżyciu i regeneracji dojrzałych neuronów, w tym neuronów ruchowych i dopaminergicznych (Wagenaar i wsp., 2018). Kolejnym istotnym czynnikiem troficznym jest czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*), który jest wytwarzany przez neurony i astrocyty w rozwijającym się mózgu. VEGF bierze udział w kilku etapach neurorozwoju, w tym migracji, różnicowaniu, synaptogenezie i mielinizacji. Ponadto VEGF stymuluje procesy naczyniowe, takie jak angiogeneza i waskulogeneza, wzmagając proliferację i migrację komórek śródbłonna. Te procesy naczyniowe razem przyczyniają się do utworzenia optymalnego mikrośrodowiska dla neuralnych komórek macierzystych, które stymuluje regenerację neuronów, tym samym wykazując ważną rolę VEGF w procesach naprawczych uszkodzonego mózgu (Wagenaar i wsp., 2018).

1.2. Modele zwierzęce udaru niedokrwiennego

Badania przedkliniczne udaru mózgu prowadzone są z zastosowaniem zwierzęcych modeli niedokrwienia mózgu, ponieważ umożliwiają prowadzenie eksperymentu w warunkach *in vivo*, odzwierciedlających procesy udaru u człowieka. Dlatego wykorzystywane są do badania mechanizmów niedokrwiennego uszkodzenia mózgu i opracowywania nowych schematów terapeutycznych (Durukan 2007). Ponieważ udar jest chorobą o złożonej patofizjologii, naśladowanie wszystkich aspektów ludzkiego udaru w jednym

modelu zwierzęcym nie jest możliwe (Li i wsp., 2021). Najczęściej stosowanym modelem zwierzęcym udaru niedokrwienego jest udar wywołany w mózgu szczura (Fluri i wsp., 2015).

Modele udaru można ogólnie podzielić na dwa typy: model niedokrwienia globalnego i model niedokrwienia lokalnego/ogniskowego. W porównaniu z modelami globalnego niedokrwienia, udar niedokrwieny wywołany ogniskowo jest bardziej zbliżony do patologii udaru niedokrwienego u ludzi (Li i wsp., 2021). Modele ogniskowego udaru niedokrwienego zwykle zachowują kilka typowych cech patofizjologicznych, w tym niewydolność energetyczną, podwyższony poziom wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} , ekscytotoksyczność, wytwarzanie wolnych rodników, zniszczenie bariery krew-mózg, stan zapalny, apoptozę i martwicę. Jeden z modeli zwierzęcych, który symuluje udar niedokrwieny mózgu człowieka opiera się na zamknięciu tętnicy środkowej mózgu (MCAO, ang. *Middle Cerebral Artery Occlusion*) (Fluri i wsp., 2015; Sommer 2017). Okluzja tętnicy środkowej mózgu może głównie powodować uszkodzenia kory i prążkowiec, ale rozległość uszkodzenia zależy od lokalizacji i czasu trwania niedrożności w naczyniu krwionośnym (Li i wsp., 2021).

Inny model wykorzystuje skrzepy zakrzepowo-zatorowe, a zatem jest wygodniejszy do badania środków trombolitycznych i procesów patofizjologicznych po trombolizie (Fluri i wsp., 2015). Zastosowanie endoteliny-1, silnego środka zwężającego naczynia krwionośne, umożliwia wywołanie przejściowego ogniskowego niedokrwienia w prawie każdym regionie mózgu i jest często wykorzystywane do modelowania udaru lakunarnego (Sommer 2017).

W celu uzyskania u gryzoni uszkodzenia niedokrwienego ograniczonego do struktur głębokich mózgu, konieczne jest zastosowanie substancji chemicznej. Podanie ouabainy powoduje chemiczną blokadę pompy ATP-azy Na^+/K^+ i skutkuje powstaniem zmian metabolicznych i strukturalnych w mózgu imitujących uszkodzenie niedokrwienne (Janowski i wsp., 2008; Dąbrowska i wsp., 2021). Pomimo stosunkowo ograniczonego uszkodzenia, zmiany takie powodują deficyty funkcjonalne, które są wykrywalne w testach behawioralnych (Janowski i wsp., 2008).

Veldhuis i wsp. (2003) w swoich badaniach mających na celu wywołanie ekscytotoksyczności wtórnej u nowonarodzonych szczurów Wistar porównali efekt

domózgowej iniekcji ouabainy oraz NMDA (N-metylo-D-asparagianu). Ekscytotoksyczność wtórna naśladuje patofizjologiczne procesy uszkodzenia mózgu wywołanego niedokrwieniem, po którym następuje nadmierna stymulacja receptora NMDA przez glutaminian uwalniany synaptycznie po depolaryzacji błony komórkowej. W porównaniu z iniekcją NMDA, ekscytotoksyczność indukowana ouabainą wywołała nadstymulację receptora glutaminianu, która lepiej odtwarza procesy zachodzące podczas ekscytotoksyczności *in vivo* wywołanej niedokrwieniem u człowieka (Veldhuis i wsp., 2003).

Należy jednak pamiętać, że modele zwierzęce udaru mózgu jedynie w pewnym przybliżeniu odzwierciedlają udar u ludzi. Spowodowane jest to między innymi tym, że udar u ludzi występuje zwykle u osób starszych, z licznymi chorobami współistniejącymi, podczas gdy badania na zwierzętach najczęściej przeprowadzane są na osobnikach młodych i zdrowych (Fluri i wsp., 2015).

Udar mózgu jest poważnym problemem zdrowia publicznego o ograniczonym leczeniu. Farmakologiczne lub mechaniczne usunięcie skrzepliny jest niestety dostępne dla niewielkiej liczby pacjentów, głównie z powodu ograniczonego czasowo okna terapeutycznego oraz niewystarczającej liczby ośrodków neuroradiologii interwencyjnej (Mangin i wsp., 2019). W ciągu ostatnich lat zapotrzebowanie na nowatorskie strategie w leczeniu pacjentów z udarem mózgu zdecydowanie wzrosło (Incontri Abraham i wsp., 2019). Strategią terapeutyczną, w której upatruje się wyjątkowo obiecującego i przede wszystkim skutecznego leczenia, jest zastosowanie w badaniach klinicznych produktów leczniczych terapii zaawansowanej (ATMP, ang. *Advanced Therapy Medicinal Products*) opartych na komórkach macierzystych.

1.3. Mezenchymalne komórki macierzyste

Komórki macierzyste odpowiedzialne są za rozwój i regenerację tkanek i narządów. Mogą odnawiać swoją populację i różnicować się w wiele linii komórkowych (Bacakova i wsp., 2018), co wynika z ich zdolności do samoodnawiania (pozostając jako niezróżnicowane pomimo wielokrotnych podziałów) oraz różnicowania się w różne rodzaje komórek organizmu. Ze względu na potencjał do różnicowania można wyszczególnić komórki o charakterze totipotencjalnym, pluripotencjalnym, multipotencjalnym oraz unipotencjalnym (Bozdağ i wsp., 2018).

Totipotencjalność to zdolność pojedynczej komórki (zygoty) do wytworzenia wszystkich zróżnicowanych typów komórek tworzących zarodek oraz struktur pozazarodkowych (Posfai i wsp., 2021). Pluripotencjalność to zdolność komórek macierzystych do różnicowania w komórki wszystkich tkanek budujących organizm, wywodzących się z trzech listków zarodkowych – endodermy, mezodermy i ektodermy. Multipotencjalne komórki macierzyste mogą różnicować się do komórek różnych tkanek, ale pochodzących z tego samego listka zarodkowego. Rezydujące w niszach określonych tkanek unipotencjalne komórki macierzyste dają początek ostatecznie zróżnicowanym komórkom tylko określonej tkanki (Kolios i wsp., 2013).

Klasyfikacja komórek macierzystych ze względu na pochodzenie wyróżnia zarodkowe (embrionalne) komórki macierzyste znajdujące się w węźle zarodkowym blastocysty oraz dojrzałe (somatyczne) komórki macierzyste występujące w tkankach (Johnson i wsp., 2017). W stosunku do komórek macierzystych somatycznych stosuje się również pojęcie „tkankowo specyficzne”, co wydaje się być bardziej zasadne, ponieważ uwzględnia komórki macierzyste rezydujące w tkankach zarówno rozwijającego się organizmu, jak i dorosłego.

Mezenchymalne komórki macierzyste/stromalne, zwane również komórkami zrębu (MSC, ang. *Mesenchymal Stem/Stromal Cells*), to populacja komórek pochodząca z mezodermy, która może być pozyskiwana zarówno z tkanek dorosłych, jak i tkanek płodu (Chatzistamatiou i wsp., 2014). Najlepiej poznanymi i najwcześniej zdefiniowanymi przez badaczy mezenchymalnymi komórkami macierzystymi są MSC izolowane ze szpiku kostnego (BM-MSC, ang. *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*). Komórki o wrzecionowatym kształcie i morfologii fibroblastów zostały po raz pierwszy opisane i scharakteryzowane już w latach 70. XX wieku przez Friedensteina i wsp. (Friedenstein i wsp., 1970; Charbord 2010; Chu i wsp., 2020). Niezależne zespoły badaczy potwierdziły później występowanie w szpiku komórek zdolnych do różnicowania w linii mezodermalnej.

MSC, zgodnie z ustalonymi w 2006 roku wytycznymi Międzynarodowego Towarzystwa Terapii Komórkowej (ISCT, ang. *International Society for Cellular Therapy*) muszą spełniać trzy podstawowe kryteria:

1) zdolność adhezji do powierzchni plastiku oraz morfologia podobna do fibroblastów;

2) ekspresja specyficznych markerów powierzchniowych CD (ang. *Cluster of Differentiation*): CD73 (ekto-5'-nukleotydaza), CD90 (Thy-1, ang. *Thymus cell antigen-1*) oraz CD105 (endoglina), przy jednoczesnym braku markerów komórek hematopoetycznych (CD45, CD34, CD11b, CD19, HLA-DR);

3) charakter multipotencjalny, czyli zdolność do różnicowania w kierunku komórek tkanki tłuszczowej (adipocyty), kostnej (osteocyty) oraz chrzęstnej (chondrocyty) (Dominici i wsp., 2006).

Ze względu na właściwości immunomodulacyjne (Murphy i wsp., 2013), neuroprotektoryjne (Dąbrowska i wsp., 2018) oraz parakryne, MSC stanowią obecnie najczęściej wykorzystywane źródło komórek macierzystych w zarejestrowanych próbach klinicznych (www.clinicaltrials.gov). Mezenchymalne komórki macierzyste są szeroko stosowane w klinice również ze względu na bezpieczeństwo ich użycia w porównaniu z zarodkowymi komórkami macierzystymi (ESC, ang. *Embryonic Stem Cells*) i indukowanymi pluripotencjalnymi komórkami macierzystymi (iPSC, ang. *induced Pluripotent Stem Cells*) (Liau i wsp., 2020). Ponadto, badania wykazały, że BM-MSK mogą wpływać na mikrośrodowisko w miejscu uszkodzenia poprzez wydzielanie czynników przeciwzapalnych lub obniżanie poziomów cytokin prozapalnych: IL-1 β , IL-6 i TNF- α . Komórki mogą również indukować sekrecję cząsteczek antyapoptotycznych i czynników troficznych stymulujących endogenną angiogenezę i immunomodulację (Suda i wsp., 2020).

Wiele dowodów przedklinicznych wskazuje, że MSC mają zdolność do łagodzenia uszkodzeń tkanek i ułatwiania regeneracji funkcjonalnej poprzez wiele procesów, w tym immunomodulację, działanie proangiogenne, wydzielanie czynników neurotroficznych i różnicowanie neuronalne (Kawabori i wsp., 2020). Zastosowanie terapeutyczne MSC pozyskiwanych z dorosłych tkanek, wiąże się jednak z inwazyjną i bolesną procedurą izolacji oraz ryzykiem infekcji. Ponadto, sama zawartość komórek macierzystych w tkance również ogranicza wykorzystanie klasycznych źródeł MSC (takich jak szpik kostny czy tkanka tłuszczowa) w wielu zastosowaniach klinicznych (Christodoulou 2013; Abbaszadeh i wsp., 2020). Stan zdrowia, genetyka, jak i wiek dawcy także wpływają na zdolność do proliferacji i różnicowania pozyskanych MSC (Abbaszadeh i wsp., 2020).

Komórki pozyskiwane z tkanek płodu mogą wydzielać takie czynniki jak: 2,3-dioksygenaza indoloaminy (IDO, ang. *Indoleamine 2,3-dioxygenase*), prostaglandyna E2 (PGE2, ang. *Prostaglandin E2*), gen indukowany czynnikiem martwicy nowotworów (TSG-6, ang. *Tumor necrosis factor stimulated gene 6*), które są mediatorami supresyjnymi modulującymi odpowiedź immunologiczną (Wu i wsp., 2020). Ponadto, poprzez swoje immunomodulacyjne działanie parakryne mogą obniżać poziom cytokin zapalnych, takich jak IFN- γ , TNF- α , IL-1, IL-6, IL-17 i jednocześnie zwiększać poziom ekspresji przeciwzapalnych IL-4, IL-10 i TGF- β w surowicy lub tkankach docelowych po ich przeszczepie (Yang i wsp., 2021). Ponadto, MSC pozyskiwane z tkanek płodu mogą wydzielać różne czynniki wzrostu w celu wzmocnienia efektów terapeutycznych, na przykład VEGF lub angiopoetyna (ANG-1, ang. *Angiopoietin-1*), co zwiększa skuteczność przeszczepu i stymuluje angiogenezę (Maacha i wsp., 2020; Yang i wsp., 2021).

W obrębie sznura pępowinowego wyróżnia się kilka obszarów anatomicznych: nabłonek owodniowy, region podowodniowy, region okołonaczyniowy, galaretę Whartona oraz naczynia krwionośne – dwie tętnice oraz jedną żyłę pępowinową. Galareta Whartona jest galaretowatą tkanką łączną, bogatą w proteoglikany, włókna kolagenowe i kwas hialuronowy (Conconi i wsp., 2011; Jeschke i wsp., 2011). Sznur pępowinowy stanowi odpad medyczny, z tego względu pozyskiwanie komórek z galarety Whartona nie stanowi zagrożenia dla dawcy i wiąże się z minimalnymi kosztami pozyskania materiału. MSC wyizolowane z tkanek płodu wykazują podobne cechy charakterystyczne dla MSC pochodzących z tkanek dojrzałych, ale jednocześnie większy potencjał proliferacyjny i mniejsze oznaki starzenia w porównaniu z MSC uzyskanymi z innych źródeł (Christodoulou i wsp., 2013; Liao i wsp., 2020). Dodatkowo, MSC pozyskane z galarety Whartona (WJ-MSC) wykazują zdolność do wieloliniowego różnicowania przez dłuższy czas w hodowli *in vitro* niż MSC izolowane ze szpiku kostnego lub tkanki tłuszczowej (Liao i wsp., 2020). WJ-MSC mogą być stosowane w celu łagodzenia chorób o podłożu immunologicznym w oparciu o ich właściwości immunomodulacyjne – wykazują mniejszą immunogenność i mają wyższą aktywność immunosupresyjną w porównaniu z BM-MSC (Yang i wsp., 2021).

WJ-MSC wykazują ekspresję niektórych markerów typowych dla zarodkowych komórek macierzystych, takich jak: Tra-1-60 (ang. *Tumor Rejection*

Antigen 1-60), Tra-1-81, SSEA-1 (ang. *Stage Specific Embryonic Antigen*) i SSEA-4 oraz innych genów pluripotencji, choć na niskim poziomie, w tym Oct-4 (ang. *Octamer-Binding Transcription Factor-4*), Nanog i SOX-2 (ang. *SRY-related HMG-box*) (Marino i wsp., 2019). Co więcej, dowiedziono, że WJ-MSC wykazują minimalną ekspresję głównego układu zgodności tkankowej (MHC, ang. *Major Histocompatibility Complex*) klasy I i brak ekspresji MHC-II, co chroni je przed lizą za pośrednictwem komórek NK (ang. *Natural Killer*) biorcy, dlatego mogą być przeszczepiane nie tylko w układzie autologicznym, ale również allogenicznym i są zatwierdzone do leczenia choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD, ang. *Graft-Versus-Host Disease*) w wielu krajach (Kawabori i wsp., 2020). MSC nie wykazują również ekspresji cząsteczek kostymulujących CD40, CD80 i CD86 i mają wysoki poziom inhibitorów odpornościowych, takich jak PGE2, IDO1 i HLA-G (Abbaszadeh i wsp., 2020).

Oprócz unikalnych właściwości immunomodulacyjnych wykazano, iż WJ-MSC posiadają zdolność do różnicowania nie tylko w komórki wywodzące się z mezodermy, lecz także w komórki pochodzące z innych listków zarodkowych. WJ-MSC wykazują spontaniczną ekspresję markerów związanych z różnicowaniem neuralnym w standardowej pożywce wzrostowej, bez zastosowania czynników różnicujących. W przeciwieństwie do komórek izolowanych z dorosłych tkanek, np. szpiku kostnego, WJ-MSC wykazują wyraźnie zwiększoną ekspresję markerów takich jak: nestyna, β -Tubulina III, neurofilament NF-200 czy glejowe kwaśne białko włóknikowe (GFAP, ang. *Glial Fibrillary Acidic Protein*) (Drela i wsp., 2016). Zaobserwowano również, iż sposób izolacji WJ-MSC istotnie wpływa na poziom ekspresji markerów związanych z różnicowaniem neuralnym. Analizując różne protokoły izolacji WJ-MSC, w tym dwie najpowszechniejsze techniki – mechaniczną fragmentację tkanki przy użyciu narzędzia do biopsji oraz metodę enzymatyczną poprzez zastosowanie różnych enzymów, zaobserwowano znaczne obniżenie ekspresji markerów neuralnych w WJ-MSC pozyskanych metodą enzymatyczną (Lech i wsp., 2016).

Odpowiednie przygotowanie komórek przed transplantacją, oprócz wyboru źródła, metody izolacji i późniejszego podania do pacjenta, powinno również obejmować zapewnienie warunków w hodowli *in vitro* jak najbardziej zbliżonych do występujących w endogennej niszy komórek macierzystych.

1.4. Nisza komórek macierzystych i warunki biomimetyczne *in vitro*

Nisza to wyspecjalizowane i dynamiczne mikrośrodowisko, które odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu właściwości komórek macierzystych. Na przestrzeni lat badania dotyczące mikrośrodowiska niszy pozwoliły na określenie interakcji komórka – komórka, komórka – macierz zewnątrzkomórkowa, poznanie dużej liczby rozpuszczalnych czynników sygnalizacyjnych oraz różnych sygnałów biochemicznych i biofizycznych (Singh i wsp., 2019). Procesy rozwojowe komórek macierzystych, takie jak przeżycie, proliferacja, różnicowanie i decyzje o dalszym losie, są kontrolowane przez wzajemne interakcje między komórkami a komponentami występującymi w endogennej niszy. Tego typu interakcje są specyficzne dla danej tkanki i zdeterminowane przez właściwości składników niszy oraz obecność innych typów komórek (Bużańska i wsp., 2018).

W warunkach *in vivo* MSC i składniki mikrośrodowiska pozostają w ciągłej, dynamicznej interakcji. W oddziaływanie mikrośrodowiska na komórki macierzyste zaangażowane są różne czynniki występujące w niszy, w tym macierz zewnątrzkomórkowa (ECM, ang. *Extracellular Matrix*). Komórki przylegają do ECM za pośrednictwem receptorów powierzchniowych, z których główną klasę stanowią integryny (Assis-Ribas i wsp., 2018). Oprócz sygnałów biochemicznych pochodzących z niszy, utrzymanie i różnicowanie komórek macierzystych jest regulowane również przez biofizyczne aspekty mikrośrodowiska, w tym obciążenie mechaniczne, właściwości materiału podłoża i kształt komórki (Lv i wsp., 2015). Interakcje komórek z niszą są wzajemne, ponieważ komórki mogą przemodelować niszę w odpowiedzi na sygnały, które od niej otrzymują. W wyniku zaburzeń tych interakcji może dojść do różnego rodzaju zmian fenotypowych w komórkach oraz w ich dalszym różnicowaniu i funkcjonowaniu. W przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej biorą udział proteiny, głównie z grupy metaloproteinaz (MMP, ang. *Matrix Metalloproteinases*). MMP należą do zależnych od cynku enzymów, które są niezbędne dla dynamiki ECM i sygnalizacji tkankowej, dlatego zmiany w ich aktywności są kluczowe dla homeostazy organizmu, rozwoju, a także są odpowiedzialne za występowanie wielu chorób (Assis-Ribas i wsp., 2018). Poznanie sposobu, w jaki komórki reagują na bodźce z mikrośrodowiska endogennej niszy jest niezbędne w inżynierii tkankowej do projektowania biomateriałów imitujących środowisko fizjologiczne oraz do rozwoju zastosowań klinicznych opartych na komórkach macierzystych (Lv i wsp., 2015).

Hodowle dwuwymiarowe (2D) *in vitro*, standardowo prowadzone w laboratoriach są warunkami wymuszonymi dla komórek, ale pozwalają na ocenę morfometryczną, fenotypową i zapewniają łatwość w manipulacji komórkami. Dlatego w zależności od pytania badawczego i dostępnych środków, ważne są badania prowadzone w hodowli 2D. Nie należy jednak zapominać, że rzeczywista, fizjologiczna i funkcjonalna odpowiedź komórki powinna być badana w warunkach tzw. „biomimetycznych” 3D, przypominających naturalne, endogenne mikrośrodowisko. Obecnie stosowane techniki bioinżynieryjne umożliwiają otrzymanie sztucznego mikrośrodowiska 3D, które zawiera kluczowe elementy niszy, jak białka macierzy zewnątrzkomórkowej, czynniki wzrostu, czynniki biofizyczne, mechaniczne (sztywność/elastyczność), odpowiednie stężenie tlenu, interakcje pomiędzy komórkami oraz komórek z elementami ECM (Bużańska i wsp., 2018; Singh i wsp., 2019). Biomateriały nowej generacji są zdolne do uwalniania określonych sygnałów w sposób kontrolowany przestrzennie i czasowo, tworząc w ten sposób warunki podobne do występujących *in vivo* (Prewitz i wsp., 2012; Bużańska i wsp., 2018).

W celu odwzorowania warunków panujących w endogennej niszy komórek macierzystych stosuje się m.in. trójwymiarowe nośniki/rusztowania, zwane skafoldami (ang. *scaffolds*). Mają one na celu stworzyć optymalne środowisko dla przeżycia, wzrostu i różnicowania komórek *in vitro*, zapewniając trójwymiarową sieć połączeń między komórkami. Jednocześnie mogą stanowić matrycę logistyczną do transplantacji, która umożliwi im pozostanie w miejscu przeszczepu oraz zapewni m.in. ochronę przed niepożądaną odpowiedzią immunologiczną organizmu biorcy.

Inżynieria tkankowa dotyczy między innymi zastosowania odpowiednich biomateriałów w połączeniu z komórkami macierzystymi w celu uzupełnienia miejsca objętego urazem/zanikiem tkanki, czy też zastąpienia uszkodzonej tkanki o zaburzonej funkcjonalności (Willerth i wsp., 2019). Opracowanie odpowiedniej metody transplantacji komórek przy ich wykorzystaniu w medycynie regeneracyjnej powinno przede wszystkim uwzględniać rodzaj tkanki, do której dany biomateriał zasiedlony komórkami macierzystymi zostanie podany. W tym zakresie należy skupić się na jego składzie, sztywności/elastyczności, sposobu jego umieszczenia bądź iniekcji do tkanki docelowej. Odpowiednio zaprojektowany skafold powinien stanowić matrycę logistyczną i zapewnić

przeżywalność komórek po przeszczepie poprzez ochronę przed działaniem komórek układu odpornościowego biorcy (Bużańska i wsp., 2013). Zarówno naturalne, jak i syntetyczne biomateriały mogą służyć do produkcji bioaktywnych rusztowań do kontrolowania różnicowania komórek macierzystych w kierunku odpowiedniego typu komórek danej tkanki. Rusztowania te mogą przybierać różne formy, są to między innymi hydrożele, mikro- i nanowłókna uzyskane metodą elektroprzędzenia, czy też mikro- i nanosfery lub skafoldy składające się z białek macierzy zewnątrzkomórkowej, takich jak kolagen, fibryna, fibronektyna, witronektyna (Willerth i wsp., 2019).

Produkty inżynierii tkankowej to nowy rodzaj produktów terapeutycznych powstałych w wyniku połączenia komórek z elementami sztucznej niszy, takimi jak rusztowania biomateriałowe, wzbogacone obecnością aktywnych białek – cząsteczek sygnałowych (**Ryc.1.**). Takie konstrukty komórkowo-biomateriałowe można wykorzystać do regeneracji uszkodzonych tkanek, otwierając w ten sposób nowe możliwości leczenia złożonych schorzeń (Vives i wsp., 2021). Rusztowanie powinno być biokompatybilne, biodegradowalne i korzystnie wpływać na interakcje między komórkami a biomateriałem (de la Puente i wsp., 2014).

Zmieniając skład, architekturę oraz właściwości fizykochemiczne tworzonych rusztowań, naturalnych bądź syntetycznych, można sterować kierunkiem różnicowania zasiedlających biomateriał komórek macierzystych (Bacakova i wsp., 2018). Do zastosowań w inżynierii tkankowej w celu m.in. dostarczenia komórek w miejsce uszkodzonej tkanki, mogą być wykorzystywane naturalne rusztowania polimerowe. Wynika to z ich właściwości, takich jak wysoka biokompatybilność, regulowana wytrzymałość mechaniczna, odpowiednia powierzchnia (Ebhodaghe 2021). Naturalne biopolimery są materiałami pochodzenia roślinnego lub tkankowego, powszechnie występującymi w przyrodzie, jak jedwab, kolagen, kwas hialuronowy, żelatyna, chitozan czy alginian. Biokompatybilność, biodegradowalność, mniejsza toksyczność i dostępność metaboliczna produktów ich degradacji sprawia, iż mogą być z większym powodzeniem stosowane w inżynierii tkankowej niż polimery syntetyczne (Ebhodaghe 2021).

Coraz więcej badań dotyczących wykorzystania skafoldów jako nośnika/matrycy dla komórek macierzystych opiera się również na otrzymaniu rusztowań o strukturze możliwej do iniekcji hydrożelu. Hydrożele składają się

z sieci hydrofilowych materiałów polimerowych zarówno naturalnych – chitozan (Di Martino i wsp., 2005), alginat (Bron i wsp., 2011), kwas hialuronowy (Kenne i wsp., 2013), kolagen (Ferreira i wsp., 2012), agaroza (Tilwani i wsp., 2012), jak i syntetycznych – politlenek etylenu (Li i wsp., 2020), poliuretan (Hung i wsp., 2014), polikaprolakton (Zhou i wsp., 2020), które są zdolne do wiązania cząsteczek wody. Są one przydatne w wielu zastosowaniach biomedycznych, w tym w dostarczaniu leków i regeneracji tkanek (Oyen 2014), głównie ze względu na ich biokompatybilność. Z perspektywy inżynierii tkankowej wyjątkowo obiecujące są hydrożele termowrażliwe. W niskiej temperaturze są one płynnym roztworem, natomiast wraz ze wzrostem temperatury ulegają procesowi żelowania/sieciowania (Kondiah i wsp., 2016). Umożliwia to iniekcję hydrożelu w postaci cieczy, co zapewnia hydrożelowi możliwość dopasowania się do miejsca uszkodzenia, zanim stanie się żelem. Tego rodzaju hydrożele można podawać w uszkodzone miejsce przy użyciu minimalnie inwazyjnych technik (Lynch i wsp., 2021).

Składnikiem hydrożelu może być fibryna – białko pochodzące z surowicy, które odgrywa istotną rolę w procesie krzepnięcia krwi. Aby zatrzymać krwawienie, trombina rozszczepia fibrynogen na monomery fibryny, które łączą się we włóknistą trójwymiarową sieć (Ahmed i wsp., 2008). Polimeryzacja fibryny obejmuje szereg następujących po sobie reakcji, z których każda wpływa na ostateczną strukturę porowatej sieci 3D (Litvinov i wsp., 2021). Fibryna jest obiektem szczególnego zainteresowania, ponieważ jej prekursorzy – fibrynogen i trombina – mogą pochodzić z krwi pacjenta, co umożliwia otrzymanie całkowicie autologicznych rusztowań (Noori i wsp., 2017). Fibryna zastosowana jako matryca dla komórek utrzymuje ich przyleganie w miejscu urazu i jednocześnie zapewnia środowisko, które chroni przeszczepione komórki przed działaniem układu immunologicznego biorcy (Roura i wsp., 2017). Samą fibrynę lub w połączeniu z innymi materiałami stosowano jako biologiczne rusztowanie dla komórek macierzystych w celu regeneracji tkanki tłuszczowej, kości, serca, chrząstki, wątroby, skóry, ścięgien czy więzadeł (Ahmed i wsp., 2008; Verma i wsp., 2011; Stabenfeldt i wsp., 2011; Sargeant i wsp., 2012). Ponadto wykazano, że osadzenie neuralnych komórek macierzystych w trójwymiarowych rusztowaniach fibrynowych zwiększa przeżycie komórek i ich dalsze różnicowanie neuronalne po przeszczepie do uszkodzonego rdzenia kręgowego (Lu i wsp., 2014). Dowiedziono również, że żel fibrynowy uzyskany z krwi pępowinowej charakteryzuje się

specyficznym profilem białkowym, który przyczynia się do regeneracji tkanek (Mallis i wsp., 2019).

Komórki MSC izolowane z tkanki tłuszczowej i hodowane na rusztowaniach hydrożelowych wykonanych na bazie fibrynogenu (FB) wykazywały wysoką zdolność do proliferacji. Zaobserwowano ponadto znaczny wzrost ekspresji genów pluripotencji: *OCT-4* i *SOX-2* oraz białka Nanog w komórkach hodowanych w warunkach 3D w porównaniu do standardowych warunków 2D, co wskazuje, iż skafoldy fibrynowe mogą być użyteczne w celu utrzymania macierzystego charakteru komórek MSC (Mousavifard i wsp., 2020).

Skafoldy fibrynowe jako nośnik dla komórek macierzystych mogą znaleźć także zastosowanie w regeneracji kości. Badania Bensaïd i wsp. (2003) wskazują, że stężenie fibrynogenu 18 mg/ml oraz trombiny 100 IU/ml były optymalne do stworzenia rusztowań fibrynowych umożliwiających rozprzestrzenianie się i proliferację BM-MSK oraz ekspresję fosfatazy alkalicznej. Po podaniu komórek do myszy nu/nu MSC były w stanie migrować z hydrożelu i zasiedlać rusztowanie ceramiczne na bazie węglanu wapnia, co sugeruje, że skafoldy FB mogą być wykorzystywane jako nośnik dla MSC w regeneracji ubytków kostnych (Bensaïd i wsp., 2003).

Terapie oparte na komórkach macierzystych są atrakcyjnymi metodami medycyny regeneracyjnej również w leczeniu chorób siatkówki. Soleimannejad i wsp. (2018) zastosowali żel fibrynowy jako rusztowanie hydrożelowe dla komórek izolowanych ze spojówki (CJ-MSK, ang. *Conjunctiva Mesenchymal Stem Cells*). Pozyskane komórki były różnicowane do komórek podobnych do fotoreceptorów przez ekspozycję z tauryną w standardowych warunkach dwuwymiarowej hodowli jak i w hydrożelach fibrynowych. CJ-MSK wykazywały wysoką adhezję do struktury rusztowania, nie zaobserwowano działania toksycznego, a przeżywalność komórek była wyższa w hydrożelach w porównaniu z komórkami hodowanymi w warunkach 2D. Ponadto, ekspresja markerów dla komórek fotoreceptorów, takich jak rodopsyna oraz peryferyna wzrosła w komórkach hodowanych w skafoldach fibrynowych. Tym samym, zastosowanie komórek macierzystych w połączeniu z hydrożelami może być interesującą strategią zwiększania liczby fotoreceptorowych komórek progenitorowych w celu naprawy i regeneracji chorób siatkówki, takich jak uszkodzenie fotoreceptorów (Soleimannejad i wsp., 2018).

Podsumowując, można stwierdzić, iż fibryna jest wszechstronnym biopolimerem, który wykazuje ogromny potencjał w regeneracji tkanek i gojeniu się ran (Ahmed 2008). Niestety szybka degradacja fibryny pozostaje głównym ograniczeniem w wielu zastosowaniach inżynierii tkankowej (Robinson i wsp., 2017).

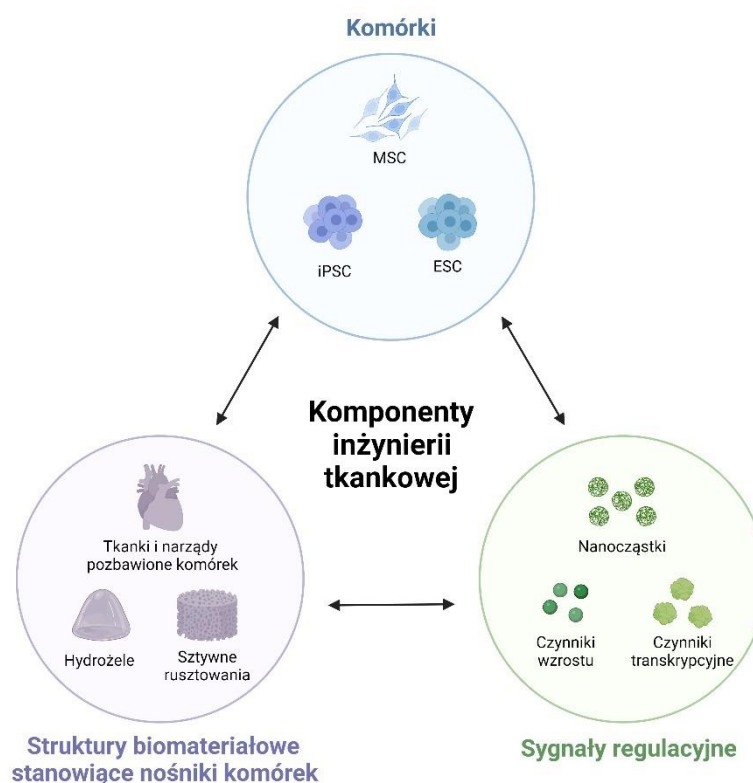
Innym biomateriałem naturalnym jest lizat płytkowy (LP) – płynna frakcja powstała z płytek krwi w wyniku cykli ich zamrażania i rozmrażania, bezpośredniej aktywacji płytek, sonifikacji lub sonifikacji w połączeniu z termolizą i obróbką rozpuszczalnikiem/detergentem (Guiotto i wsp., 2020). LP stanowi obecnie przedmiot badań w dziedzinie naprawy i regeneracji tkanek. Ludzki lizat płytkowy, oprócz zastosowania jako skuteczny zamiennik surowicy pochodzenia zwierzęcego w pożywce wzrostowej dla komórek w hodowli *in vitro* (Tancharoen i wsp., 2019), może być również wykorzystywany jako składnik rusztowania w podobny sposób, jak w przypadku hydrożeli wykonanych z fibrynogenu. Z racji zawartości frakcji fibrynogenu ulega sieciowaniu pod wpływem trombiny. Badania wykazały, że rusztowania oparte na LP zwiększają adhezję i proliferację fibroblastów oraz komórek śródbłonna, a jednocześnie nie wpływają na profil ekspresji markerów powierzchniowych komórek MSC i mogą skrócić czas hodowli poprzez zwiększenie tempa proliferacji (Shichinohe i wsp., 2011).

Dane literaturowe wskazują na pozytywny wpływ lizatu płytkowego na zdolność mezenchymalnych komórek macierzystych do proliferacji i wieloliniowego różnicowania (Doucet i wsp., 2005; Pérez-Ilzarbe i wsp., 2009). W badaniach Jooybar i wsp. (2019) ludzki lizat płytkowy został wykorzystany jako autologiczne źródło czynników wzrostu, wzbogacające trójwymiarowe mikrośrodowisko dla komórek MSC. Lizat płytkowy odgrywał kluczową rolę we wspieraniu aktywności ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych, takich jak adhezja komórek, żywotność i proliferacja w trójwymiarowej strukturze hydrożelu z kwasu hialuronowo-tyraminowego. Zaobserwowano, iż w przypadku zwykłych hydrożeli, bez dodatku LP, komórki wciąż zachowywały kulisty kształt, natomiast w skafoldach wzbogaconych lizatem płytkowym, MSC adherowały i rozprzestrzeniały się w strukturze rusztowania. Dodatkowo, LP indukował komórki MSC wysiane w hydrożelach do wytwarzania chrząstki szklistej po umieszczeniu w pożywce do różnicowania w kierunku chondrocytów oraz odkładania macierzy zewnątrzkomórkowej, w szczególności kolagenu typu II

i proteoglikanów. Zasiedlony komórkami i możliwy do iniekcji hydrożel wzbogacony lizatem płytkowym, a tym samym minimalnie inwazyjny i bogaty w autologiczne czynniki wzrostu pacjenta jest obiecujący do zastosowania w celu regeneracji chrząstki (Jooybar i wsp., 2019).

Aby uzyskać tkankę podobną do chrząstki, rusztowania 3D są niezbędne do utrzymania zróżnicowanego stanu chondrocytów. W badaniach dotyczących regeneracji chrząstki zastosowano bioaktywne rusztowania oparte na lizacie płytkowym w celu utrzymania hodowli komórek MSC oraz stymulacji różnicowania chondrogenego. MSC izolowane ze szpiku kostnego dorosłego królika zamykano w rusztowaniach z króliczego lizatu płytkowego i utrzymywano w hodowli w medium wzrostowym z dodatkiem czynników indukujących chondrogenezę. Zastosowanie bioaktywnego rusztowania LP, połączonego z odpowiednią pożywką różnicującą stymulowało chondrogenezę MSC. Rusztowania zapewniły odkładanie metachromatycznej macierzy zewnątrzkomórkowej, tworzenie grup izogenicznych i typowe nagromadzenie komórek w jamkach (Moroz i wsp., 2013).

Robinson i wsp. (2016) wykazali, że hydrożel wykonany z lizatu płytkowego stymulował aktywność proangiogenną ludzkich MSC oraz różnicowanie komórek śródbłonna. W mysim modelu niedokrwienia kończyn tylnych zaobserwowano z kolei poprawę miejscowej perfuzji tkanek po podaniu komórek MSC w skafoldach z lizatu płytkowego. Dodatkowo, hydrożele LP były odporne na degradację proteazową. Sugeruje to, iż mogą być z powodzeniem stosowane jako rusztowania do dostarczania MSC do niedokrwionych tkanek w celu stymulowania regeneracji naczyń (Robinson i wsp., 2016).



Ryc.1. Schemat przedstawiający poszczególne komponenty wykorzystywane w inżynierii tkankowej. Wykonano w programie BioRender.

1.5. Odwzorowanie mikrośrodowiska *in vitro* – optymalizacja hodowli komórkowej

W hodowli komórkowej pożywki wzrostowe i odpowiednia suplementacja odgrywają ważną rolę w zapewnieniu warunków biomimetycznych do prawidłowego rozwoju komórek. W przeważającej większości stosowana jest surowica pochodzenia zwierzęcego, która służy jako źródło hormonów, czynników wzrostu, aminokwasów, białek, witamin, soli nieorganicznych, pierwiastków śladowych, węglowodanów, lipidów itp. niezbędnych dla metabolizmu komórkowego i zapewnienia wzrostu komórek. Najczęściej wykorzystywana jest płodowa surowica bydlęca (FBS, ang. *Fetal Bovine Serum*), którą zaczęto stosować w hodowli komórkowej w latach pięćdziesiątych XX wieku. W porównaniu z surowicami pozyskiwanymi z innych źródeł (surowica końska czy cielęca), FBS zawiera więcej czynników wzrostu oraz niski poziom γ -globuliny, która jest inhibitorem wzrostu komórek (Subbiahanadar Chelladurai i wsp., 2021). Istnieją jednak obawy dotyczące wykorzystywania surowicy zwierzęcej w zastosowaniach terapeutycznych ze względu na ryzyko przenoszenia patogenów (Tancharoen

i wsp., 2019). Stosowanie płodowej surowicy bydlęcej jako dodatku do hodowli komórek jest również odradzane przez organy regulacyjne w celu ograniczenia ryzyka chorób odzwierzęcych i ksenogenicznych reakcji immunologicznych organizmu biorcy (Astori i wsp., 2016). Ze względów bezpieczeństwa sugeruje się, że ludzki lizat płytkowy może korzystnie zastąpić FBS, ponieważ jest naturalnym (pochodzenia ludzkiego) źródłem czynników wzrostu (Tancharoen i wsp., 2019).

Badania porównawcze FBS oraz lizatu płytkowego jako surowicy dodawanej do pożywki przeprowadzono w dużej mierze przy użyciu mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych ze szpiku kostnego lub tkanki tłuszczowej. Guiotto i wsp. (2020) dokonali analizy wyników z 56 publikacji dotyczących porównania zastosowania FBS oraz LP w pożywce wzrostowej i ich wpływu na właściwości ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych. Dane wskazują, że MSC namnożone w pożywce z dodatkiem LP posiadały wydłużony, wrzecionowaty kształt o morfologii fibroblastów oraz wykazywały zwiększoną proliferację w porównaniu do MSC hodowanych z dodatkiem FBS. Komórki zachowały zdolność do tworzenia ośrodków proliferacji (CFU, ang. *Colony-Forming Units*), wysoką ekspresję mezenchymalnych markerów powierzchniowych CD oraz potencjał do różnicowania mezodermalnego (adipocyty, osteocyty, chondrocyty) *in vitro* (Guiotto i wsp., 2020).

Lizat płytkowy można również z powodzeniem zastosować podczas namnażania MSC z różnych innych źródeł, w tym galarety Whartona, płynu owodniowego czy miazgi zębowej (Barro i wsp., 2021). Komórki MSC izolowane z ludzkiego płynu owodniowego (AF-MSC, ang. *Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells*) i hodowane w pożywce z dodatkiem lizatu płytkowego lub FBS miały morfologię podobną do fibroblastów oraz porównywalne tempo wzrostu i ekspresję markerów mezenchymalnych. Zaobserwowano jednak, że komórki hodowane z dodatkiem lizatu płytkowego wykazywały podwyższony poziom ekspresji genów typowych dla komórek śródbłoka w porównaniu z MSC hodowanymi z dodatkiem FBS (Tancharoen i wsp., 2019). W przypadku komórek MSC izolowanych z galarety Whartona dodanie lizatu płytkowego w miejsce FBS, również skutkowało uzyskaniem populacji komórek o typowej morfologii fibroblastów. Ponadto, zaobserwowano krótszy czas podwajania populacji (szybszą proliferację) i wydajniejszą zdolność do różnicowania w komórki tkanki chrzęstnej, kostnej i tłuszczowej w porównaniu z WJ-MSC hodowanymi w pożywce suplementowanej

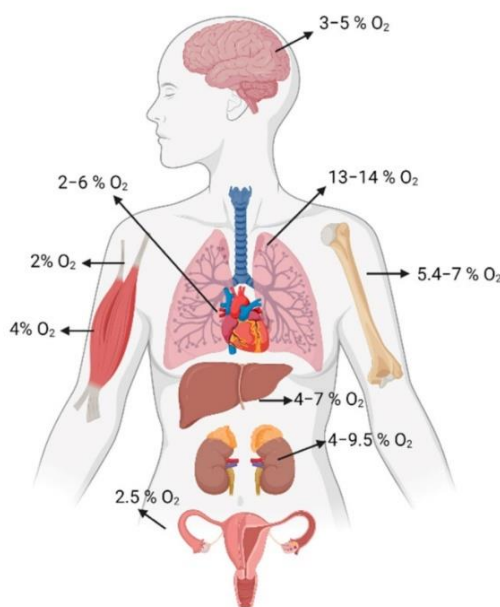
FBS (Chen i wsp., 2019). Lizat płytkowy okazuje się być również skuteczny w hodowli ludzkich zróżnicowanych komórek, takich jak chondrocyty, komórki śródbłonka czy nabłonka rogówki do zastosowań terapeutycznych oraz inżynierii tkankowej (Barro i wsp., 2021).

Optymalnym podejściem w hodowli komórek *in vitro* jest zatem wykorzystanie ludzkiego lizatu płytkowego w miejsce ksenogenicznego serum pochodzenia zwierzęcego. Jest to jednocześnie wyjątkowo korzystne w hodowli komórek macierzystych zgodnie z zaleceniami Dobrej Praktyki Wytwarzania (GMP, ang. *Good Manufacturing Practice*), jeśli miałyby zostać następnie podane pacjentowi. Namnożenie komórek w hodowli *in vitro* jest niezbędne, ze względu na ograniczoną dostępność, niewystarczająco efektywne metody izolacji i konieczność podania dużej liczby komórek pacjentowi. Szacuje się, że dla osiągnięcia optymalnego rezultatu, powinno się jednorazowo przeszczepiać około $20\text{--}100 \times 10^6$ komórek (Drela i wsp., 2019). Jednakże wiele protokołów dotyczących hodowli i namnażania komórek macierzystych wciąż opiera się na wykorzystaniu FBS. Walidacja produktu leczniczego terapii zaawansowanej powinna zatem zdecydowanie obejmować eliminację surowicy pochodzenia zwierzęcego z pożywki wzrostowej (Bieback 2013).

Kolejną ważną kwestią jest dostosowanie stężenia tlenu w hodowli *in vitro*. Tlen jest niezbędny dla większości organizmów, ponieważ jest podstawowym substratem w reakcjach metabolizmu komórkowego do produkcji energii, a jego poziom jest precyzyjnie regulowany. Zbyt duża lub zbyt mała podaż tlenu może być śmiertelna dla organizmu, z tego względu kluczowe znaczenie mają mechanizmy szybkiej odpowiedzi na zmieniające się poziomy tlenu. Sposób, w jaki komórki i tkanki wyczuwają obniżone stężenie tlenu, pozostawał niewyjaśniony aż do końca XX wieku. William G. Kaelin Jr., Sir Peter J. Ratcliffe oraz Gregg L. Semenza otrzymali w 2019 roku nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny za przełomowe odkrycia dotyczące tego, w jaki sposób komórki są w stanie wyczuwać i reagować na tlen (Griffioen i wsp., 2019; Lee i wsp., 2020). Badacze odkryli i opisali czynnik indukowany hipoksją (HIF, ang. *Hypoxia Inducible Factor*) – kluczowy czynnik transkrypcyjny, który reguluje ekspresję genów w odpowiedzi na spadek utlenowania komórek (Lee i wsp., 2020).

U ssaków komórki macierzyste w różnych tkankach rezydują w niszach, w ściśle kontrolowanym środowisku tlenowym, w którym poziom tlenu jest zwykle

dużo niższy w stosunku do 21% poziomu tlenu atmosferycznego, ale jest zgodny z wymaganiami niszy, zapewniając warunki „fizjologicznej normoksji” (Lech i wsp., 2016; Ivanovic 2017). Pojęcie „hipoksji”, czyli niedotlenienia oznacza warunki w niszach endogennych, w których poziom stężenia tlenu stanowi poniżej 1% (Ivanovic 2009; Ivanovic 2017). Poszczególne tkanki organizmu charakteryzują się różnym stężeniem tlenu, a zaburzenia homeostazy tlenowej prowadzą do ich uszkodzenia (Di Mattia i wsp., 2021). Ponadto, niskie stężenie tlenu (niższe od atmosferycznego) występuje w różnych niszach komórek macierzystych, co sugeruje kluczową rolę jaką tlen odgrywa w utrzymaniu stanu niezróżnicowanego komórek (**Ryc.2**).



Ryc.2. Poziomy stężenia tlenu w różnych tkankach organizmu człowieka. Źródło: Di Mattia M i wsp. *Insight into Hypoxia Stemness Control. Cells.* 2021 Aug 22;10(8):2161. doi: 10.3390/cells10082161.

Warunki tlenu atmosferycznego (21% O₂), określane często w literaturze jako „normoksja”, są nadal rutynowo stosowane dla większości hodowli komórek macierzystych *in vitro*, reprezentując stany niefizjologiczne. Warunki te wywołują stres oksydacyjny w komórkach, powodują zwiększoną produkcję reaktywnych form tlenu (ROS) i destrukcyjny wpływ na większość wewnątrzkomórkowych makrocząsteczek (np. lipidów, białek i DNA) (Lech i wsp., 2016; Ivanovic 2017).

Ekspozycja komórek na warunki fizjologicznie niskiego stężenia tlenu, tj. na poziomie wartości panujących w niszach endogennych, czyli tzw.

„fizjologicznej normoksji”, często nieprawidłowo w literaturze określaną „hipoksją”, wpływa pozytywnie na zachowanie stanu niezróżnicowanego komórek i ich macierzystego charakteru. Komórki WJ-MSC hodowane w warunkach fizjologicznej normoksji wykazują ekspresję genów charakterystycznych dla niezróżnicowanych komórek pluripotencjalnych – *SSEA-4*, *Nanog*, *OCT4A*, *OCT4B* i *SOX-2* (Obradovic i wsp., 2019), aczkolwiek w porównaniu z komórkami iPSC poziom ekspresji tych markerów jest znacznie niższy (Musiał-Wysocka i wsp., 2019). Ponadto, warunki obniżonego stężenia tlenu sprzyjają zachowaniu potencjału klonogenego oraz redukują oznaki starzenia i przedwczesną śmierć komórek (Obradovic i wsp., 2019).

Jak donoszą Kim i wsp. (2016), hodowla *in vitro* komórek MSC w warunkach tlenu atmosferycznego nie odzwierciedla stanu fizjologicznego o znacznie niższej zawartości tlenu i może powodować uszkodzenie komórek podczas hodowli. Komórki BM-MSC hodowane w warunkach 1% O₂ wykazywały zwiększoną proliferację i żywotność. Podczas długotrwałej hodowli warunki obniżonego stężenia tlenu opóźniały ponadto zmiany fenotypowe MSC związane ze starzeniem się, takie jak zwiększona objętość komórek, zmiany w morfologii, czy ekspresja β-galaktozydazy w porównaniu do warunków atmosferycznego stężenia tlenu (Kim i wsp., 2016).

Wykazano, iż komórki MSC po inkubacji w pożywce o niskiej zawartości surowicy przechodzą w stan apoptozy, jednak prekondycjonowanie komórek w warunkach obniżonego stężenia tlenu (1% O₂) może zapobiec uszkodzeniom poprzez zwiększenie wydzielania czynników angiogennych, VEGF i podstawowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF, ang. *basic Fibroblast Growth Factor*). Warunki 1% O₂ zwiększają również aktywność metaboliczną i zmniejszają aktywność kaspazy-3 oraz uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej przez MSC, co skutkuje zmniejszeniem wrażliwości MSC na ischemię bez zmian fenotypu oraz kariotypu (Hu i wsp., 2018).

Sekretom, czyli panel wydzielanych przez mezenchymalne komórki macierzyste m.in. czynników wzrostu, cytokin i chemokin stanowi podstawę ich potencjału terapeutycznego. Modulacja poziomu tlenu w środowisku wpływa zarówno na stężenie, jak i skład wydzielanych przez MSC cytokin. Zaobserwowano, że w warunkach obniżonego stężenia tlenu (2% O₂) stężenie takich cytokin jak: NGF, IL-2, czynnik stymulujący tworzenie kolonii

granulocytów (GCSF, ang. *Granulocyte-Colony Stimulating Factor*), VEGF, IL-4 i IL-10 wyraźnie wzrasta w porównaniu do warunków tlenu atmosferycznego (Merkhan i wsp., 2021).

Badania wskazują, że prekondycjonowanie komórek MSC w warunkach obniżonego stężenia tlenu wzmacnia ich efekty terapeutyczne. Sun i wsp. (2015) zastosowali eksperymentalny model udaru krwotocznego wywołany u dorosłych myszy C57/B6 poprzez wstrzyknięcie kolagenazy IV do prądkowia. Komórki BM-MSK prekondycjonowane przez 24 godz. w warunkach hipoksji (0,1 – 0,3% O₂), a następnie przeszczepiane donosowo, migrowały w miejsce uszkodzenia, gdzie lokalizowały się głównie wokół regionu krwiaka i stymulowały regenerację tkanek. Po podaniu BM-MSK zaobserwowano wzrost ekspresji mysich czynników wzrostu: *BDNF*, *GDNF* i *VEGF* (Sun i wsp., 2015).

W szczurzym modelu urazowego uszkodzenia mózgu (TBI, ang. *Traumatic Brain Injury*) po podaniu do żyły ogonowej szczurów pożywki wzrostowej zebranej z hodowli BM-MSK prowadzonej w warunkach hipoksji (0,5% O₂) zaobserwowano znacznie większą liczbę nowo tworzących się neuronów oraz mniejsze uszkodzenie mózgu niż u szczurów, którym podano pożywkę z MSC hodowanych w warunkach standardowych (21% O₂). Ponadto, MSC hodowane w warunkach obniżonego stężenia tlenu indukowały ekspresję między innymi czynnika wzrostu hepatocytów (*HGF*, ang. *Hepatocyte Growth Factor*) i *VEGF*. W testach behawioralnych zaobserwowano ponadto poprawę funkcji motorycznych i poznawczych (Chang i wsp., 2013).

Dane literaturowe dowodzą również, że prekondycjonowanie MSC w warunkach obniżonego stężenia O₂ (1,5%) stymuluje ich proliferację, migrację, angiogenezę, właściwości przeciwutleniające i przeciwapoptotyczne (Lan i wsp., 2015; Cruz i wsp., 2015). Wykazano także, że tak prekondycjonowane MSC hamują aktywność mikrogleju w mózgu i promują regenerację skuteczniej, niż MSC hodowane w warunkach atmosferycznego stężenia tlenu (Hu i wsp., 2018). Łącznie wskazuje to na stymulację wydzielania bioaktywnych czynników przez MSC prekondycjonowanych przed przeszczepem w warunkach obniżonego względem atmosferycznego stężenia tlenu, skutkujące zwiększeniem potencjału terapeutycznego komórek (Chang i wsp., 2013).

Zasadne jest zatem, aby w hodowli *in vitro* komórek macierzystych, dostosować stężenie tlenu do warunków tzw. „fizjologicznej normoksji”, które

odpowiadają środowisku endogennemu tkanki, z której zostały pozyskane. Odpowiednie prekondycjonowanie komórek przed przeszczepem również powinno obejmować hodowlę w warunkach stężenia tlenu zbliżonych do warunków występujących w tkance docelowej.

1.6. Eksperymentalne strategie terapeutyczne – wykorzystanie komórek macierzystych w leczeniu udaru mózgu

Terapia oparta na komórkach macierzystych może stać się nowym sposobem leczenia, który funkcjonalnie wspomaga powrót do zdrowia po udarze niedokrwiennym. Stwierdzono, że różne typy komórek, w tym jednojądrzaste komórki szpiku kostnego, mezenchymalne komórki macierzyste izolowane ze szpiku kostnego, tkanki tłuszczowej, czy tkanek płodu, mogą łagodzić deficyty neurologiczne w zwierzęcych modelach udaru mózgu (Suda i wsp., 2020; Kawabori i wsp., 2020).

Badania wskazują, że neuralne komórki macierzyste (NSC, ang. *Neural Stem Cells*) izolowane z mózgowia płodu ludzkiego po spontanicznych poronieniach, po przeszczepie do uszkodzonego mózgu szczura wykazują wysoką przeżywalność i migrację w całym prążkowie. Komórki zlokalizowane centralnie w miejscu przeszczepu wykazywały ekspresję nestyny oraz GFAP, β -Tubuliny III, doublekortyny (DCX, ang. *Doublecortin*) i kalretyniny oraz bardzo niewielki potencjał do proliferacji. Komórki NSC zlokalizowane poza bezpośrednim miejscem przeszczepu ulegały różnicowaniu, wykazywały ekspresję dojrzałych markerów neuronalnych, takich jak białko HuD (ang. *neural Hu protein*), kalbindyna i parwalbumina. Nie zaobserwowano natomiast różnicowania przeszczepionych NSC w astrocyty lub oligodendrocyty (Darsalia i wsp., 2007). W modelach udaru MCAO u gryzoni niedrożność tętnicy środkowej mózgu powoduje atrofię pierwotną, obejmującą korę mózgu oraz zmiany wtórne w obrębie prążkowie i wzgórza. Komórki NSC przeszczepione do mózgu gryzoni w tym modelu, integrowały się z tkanką biorcy, powodowały poprawę zaburzeń neurologicznych oraz zmniejszały obszar uszkodzenia (Dubois-Dauphin i wsp., 2010).

Przeszczepione komórki macierzyste wykazują działanie ochronne podczas różnych faz udaru niedokrwiennego. Są w stanie reorganizować sieć neuronową, ale także modulować miejscowe i ogólnoustrojowe stany zapalne, poprzez

wydzielanie m.in. TGF- β , IL-4 i IL-10 (Hatakeyama i wsp., 2020), promować angiogenezę i endogenną neurogenezę, wydzielać czynniki neurotroficzne, wspomagać regenerację aksonów, redukować uszkodzenia śródbłonna oraz wpływać na zmniejszenie blizny gлевой (Suda i wsp., 2020; Kawabori i wsp., 2020). We wczesnej fazie udaru mózgu, podanie komórek MSC może zmniejszać odpowiedź zapalną i redukować uszkodzenie w obszarze okołoniedokrwiennym. Po 2–3 tygodniach od uszkodzenia, późny przeszczep komórek modulował procesy naprawcze na korzyść angiogenezy i neurogenezy. W badaniach klinicznych we wczesnej fazie stwierdzono, że podawanie MSC jest bezpieczne w populacjach z udarem mózgu. Jednak skuteczność terapii MSC w podostrym i przewlekłym udarze niedokrwiennym nie została jeszcze zweryfikowana (Li i wsp., 2021).

Tak jak wspomniano, mezenchymalne komórki macierzyste mogą działać terapeutycznie w przypadku udaru mózgu, w głównej mierze poprzez stymulację endogennych procesów naprawczych, przez wydzielanie czynników neurotroficznych takich jak BDNF, czynnik wzrostu nerwów (NGF, ang. *Nerve Growth Factor*), HGF, VEGF, bFGF, czy insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF-1, ang. *Insulin-like Growth Factor 1*). Ponadto, MSC mogą stymulować endogenną neurogenezę w strefie okołokomorowej (SVZ) oraz strefie podziarnistej zakrętu zębatego hipokampa (SGZ, ang. *Subgranular Zone*) (Incontri Abraham i wsp., 2019).

W wyniku udaru niedokrwiennego komórki mikrogleju pełnią istotną rolę w uruchomionej kaskadzie zapalnej. Odpowiednia aktywacja mikrogleju ma kluczowe znaczenie dla prawidłowej neurogenezy. Prozapalny fenotyp M1 komórek mikrogleju i makrofagów jest związany z uszkodzeniem tkanek, natomiast przeciwzapalny M2 ułatwia ich regenerację. Terapia oparta na komórkach MSC działa poprzez hamowanie nadmiernej aktywacji mikrogleju M1, ale zwiększa aktywność mikrogleju M2 (Kwak i wsp., 2018).

MSC izolowane z miazgi zębowej (DP-MSC, ang. *Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells*) po przeszczepie mogą wywierać działanie immunomodulujące poprzez zwiększenie wytwarzania cytokin przeciwzapalnych i obniżenie poziomu cytokin prozapalnych. Działanie DP-MSC opiera się na parakrynnym wydzielaniu cytokin, chemokin oraz czynników wzrostu, w tym SDF-1 (ang. *Stromal Cell-Derived Factor 1*), NGF, BDNF, GDNF i VEGF. Przeszczepione DP-MSC obniżają poziom TNF- α i IL-1 β (markerów

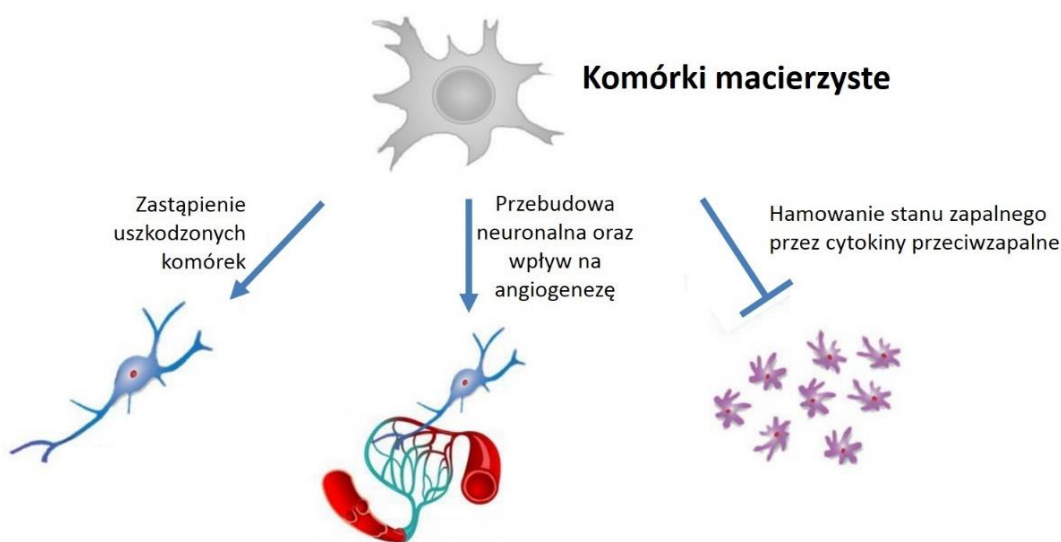
ogólnoustrojowego zapalenia) zarówno w mózgu, jak i w surowicy. Podobnie VEGF ulegający ekspresji w makrofagach, neuronach i gleju sprzyja angiogenezie w uszkodzonym w wyniku niedokrwienia mózgu podczas regeneracji tkanek (Suda i wsp., 2020).

Badania wykazały, iż ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste izolowane z tkanek płodu (z łożyska), a następnie przeszczepiane do szczurów Sprague-Dawley w eksperymentalnym modelu udaru mózgu (MCAO) wykazują działanie regeneracyjne. Szczególnie korzystne okazało się przeszczepianie komórek hodowanych w sferach 3D. Li i wsp. (2021) zaobserwowali, że podanie 1×10^6 komórek MSC hodowanych w 3D do żyły ogonowej po uszkodzeniu mózgu wywołanym okluzją tętnicy środkowej skutkowało znacznym zmniejszeniem objętości uszkodzenia tkanki w porównaniu do podania MSC hodowanych w 2D. Dożylnie podanie komórek MSC w formie hodowli trójwymiarowych spowodowało zmniejszenie liczby ameboidalnego mikrogleju, obniżenie poziomu cytokin prozapalnych i zmniejszenie ekspresji zjonizowanej cząsteczki adaptorowej wiążącej wapń 1 (Iba1, ang. *Ionized calcium-binding adapter molecule 1*), co wskazuje na osłabioną aktywację mikrogleju (Li i wsp., 2021). Podanie WJ-MSC do żyły ogonowej szczurów po 48 godz. od zamknięcia tętnicy środkowej mózgu w eksperymentalnym modelu MCAO skutkowało znaczącym przywróceniem funkcji neurologicznych. WJ-MSC zasiedlały uszkodzoną korę czołową i różnicowały się w komórki podobne do neuronów w tym regionie (Zhang i wsp., 2017).

Badania na zwierzętach wskazują, że podanie MSC skutkuje działaniem immunomodulacyjnym, o czym świadczy zmniejszona immunoreaktywność markera aktywowanego mikrogleju ED1 oraz Iba1. Komórki MSC zmniejszają również aktywację makrofagów i promują przejście stymulowanych makrofagów z prozapalnego fenotypu M1 do fenotypu przeciwzapalnego M2. Wstępne kondycjonowanie MSC w środowiskach 3D przed przeszczepem zwiększa ich właściwości przeciwzapalne poprzez wydzielanie większej liczby czynników immunomodulacyjnych, takich jak prostaglandyna E2, TGF- β 1, IL-6, TSG-6, HGF i stanniokalcyna 1 (STC1, ang. *Stanniocalcin-1*) (Li i wsp., 2021).

Działanie parakryne MSC ma korzystny wpływ na neuroregenerację, częściowo poprzez interakcję z neuronalnymi komórkami progenitorowymi (NPC, ang. *Neural Progenitor Cells*). Czynniki troficzne wydzielane przez MSC

stymulują astrogenezę, natomiast oligodendrogeniza jest dodatkowo indukowana przez bezpośredni kontakt MSC z NPC (Oppliger i wsp., 2017). Ponadto, MSC mogą być stosowane jako adiuwant w metodach leczenia skojarzonego z wykorzystaniem biomateriałów, leków oraz rehabilitacji po udarze mózgu (Incontri Abraham i wsp., 2019).



Ryc.3. Schemat mechanizmów terapii komórkowej udaru mózgu. Źródło: Hatakeyama i wsp. *Cell Therapies under Clinical Trials and Polarized Cell Therapies in Pre-Clinical Studies to Treat Ischemic Stroke and Neurological Diseases: A Literature Review. Int J Mol Sci.* 2020 Aug 27;21(17):6194. doi: 10.3390/ijms21176194 (zmodyfikowano).

Pomimo licznych korzyści, jakie potencjalnie można osiągnąć po zastosowaniu ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych w leczeniu udaru niedokrwiennego, wiele kwestii, takich jak potrzeba opracowania technik maksymalnie wzmacniających efekty terapii komórkowej w udarze, pozostaje nierozwiązanych i wymaga wyjaśnienia (Kawabori i wsp., 2020). Aby osiągnąć optymalny efekt terapeutyczny, konieczna jest optymalizacja nie tylko wyboru źródła MSC, ale również opracowanie precyzyjnych protokołów hodowli *in vitro* i sposobu transplantacji MSC w miejsce uszkodzonej tkanki. Należy zwrócić uwagę na liczne czynniki mogące zwiększyć efektywność terapii komórkowej, w tym prekondycjonowanie komórek w odpowiednich warunkach przestrzennych i tlenowych. Mimo coraz częstszego stosowania MSC w medycynie regeneracyjnej, wciąż wiele mechanizmów ich działania terapeutycznego pozostaje niewyjaśnionych i wymaga dogłębnego zbadania, aby stosowanie produktów

lecniczych opartych na komórkach macierzystych było skuteczne, jak również bezpieczne dla pacjenta.

2. Hipoteza badawcza

W niniejszej pracy postawiono następującą hipotezę badawczą:

- potencjał terapeutyczny komórek WJ-MSC zależy od warunków mikrośrodowiska *in vitro*, w którym komórki są prekondycjonowane;
- prekondycjonowanie związane z zastosowaniem warunków biomimetycznych dla tkanki nerwowej OUN (struktura skafoldów hydrożelowych 3D oraz obniżenie poziomu tlenu do „fizjologicznej normoksji” 5% O₂) ma pozytywny wpływ na potencjał terapeutyczny WJ-MSC.

Hipotezę badawczą weryfikowano w eksperymentach „*proof of concept*”, które dotyczyły badania efektu terapeutycznego WJ-MSC.

Badanie efektu terapeutycznego WJ-MSC przeprowadzono w interakcji z tkanką nerwową *ex vivo* z wykorzystaniem hodowli organotypowej uszkodzonych hipokampów szczura (*proof of concept* nr 1) oraz *in vivo* po przeszczepie WJ-MSC do mózgu szczura w eksperymentalnym modelu udaru niedokrwienego (*proof of concept* nr 2).

3. Cele pracy

Mezenchymalne komórki macierzyste w sposób aktywny reagują na otaczające mikrośrodowisko poprzez zmianę profilu sekrecji czynników wpływających m.in. na proliferację, różnicowanie i dojrzewanie komórek progenitorowych w mózgu. Neuroprotektoryny efekt transplantacji MSC wiąże się między innymi z wydzielaniem przez MSC cytokin i neurotrofin oraz stymulacją komórek endogennych do ich wydzielania.

Obecnie, gdy medycyna regeneracyjna oparta na wykorzystaniu komórek macierzystych coraz częściej jest stosowana w klinice, istnieje potrzeba opracowania odpowiednich protokołów dla metod izolacji i hodowli pozyskanych komórek, w tym poprawy/maksymalizacji ich właściwości terapeutycznych i zdolności do przeżycia po przeszczepie. Komórki macierzyste po transplantacji są narażone na silną odpowiedź immunologiczną biorcy, co znacznie utrudnia ich przeżycie oraz regenerację uszkodzonej tkanki. Aby rozwiązać ten problem, poszukuje się konkretnych nośników/rusztowań/skafoldów, które mogą chronić przeszczepione komórki przed reakcją układu odpornościowego biorcy i zwiększyć właściwości regeneracyjne przeszczepianych komórek macierzystych.

Celem pracy była ocena właściwości protekcyjnych i regeneracyjnych komórek WJ-MSC hodowanych w różnych warunkach mikrośrodowiska – określenie wpływu stężenia tlenu oraz rodzaju hodowli poprzez zastosowanie trójwymiarowych (3D) hydrożelowych skafoldów – z lizatu płytkowego (LP) oraz fibrynogenu (FB).

Praca została podzielona na trzy etapy: badania *in vitro*, *ex vivo* i *in vivo* i obejmuje ocenę porównawczą WJ-MSC hodowanych w warunkach 2D i 3D w 21% O₂ i 5% O₂.

- 1) Porównanie właściwości WJ-MSC hodowanych w warunkach 2D i 3D w 21% O₂ lub 5% O₂ – badania *in vitro* obejmujące analizę tempa proliferacji komórek, różnicowanie neuralne, a także charakterystykę zmian ekspresji neurotrofin (*BDNF*, *GDNF*), czynnika wzrostu śródbłonki naczyniowej (*VEGF-A*) oraz cytokin prozapalnych (*IL-6*, *IL-1β*) i przeciwzapalnych (*TGF-β1*);
- 2) Ocena działania neuroprotektorynego komórek WJ-MSC hodowanych w różnych warunkach przestrzennych i tlenowych – badania *ex vivo*

wykorzystujące współhodowlę komórek ze skrawkami hipokampa szczura dla określenia profilu odpowiedzi WJ-MSC na uszkodzoną tkankę nerwową;

- 3) Analiza oddziaływania WJ-MSC na uszkodzony cytotoksycznie mózg szczura – badania *in vivo* w zakresie odpowiedzi organizmu biorcy na przeszczep oraz analizy zdolności komórek do przeżycia i migracji w różnym czasie od ich podania.

Otrzymane wyniki mogą posłużyć do opracowania odpowiednich protokołów dotyczących warunków hodowli (w tym określonych warunków biomimetycznych) i metod przeszczepiania komórek macierzystych w perspektywie późniejszego opracowania innowacyjnego produktu leczniczego terapii zaawansowanej (ATMP, ang. *Advanced Therapy Medicinal Product*) w leczeniu zaburzeń ośrodkowego układu nerwowego.

4. Materiał

4.1. Mezenchymalne komórki macierzyste

Do badań *in vitro*, *ex vivo* oraz jako materiał transplantacyjny do badań *in vivo* użyto ludzkich komórek macierzystych/stromalnych izolowanych ze sznura pępowinowego (WJ-MSC). Materiał pozyskano w Klinice Położnictwa i Ginekologii Szpitala Klinicznego Dzieciątka Jezus w Warszawie. Materiał do badań pobierano po uzyskaniu świadomych zgód od matek. Pobranie materiału oraz zastosowanie go w celach badawczych zostało zaopiniowane przez Komisję Bioetyczną przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym (KB/213/2016).

4.2. Zwierzęta doświadczalne

Badania *ex vivo* i *in vivo* przeprowadzono z wykorzystaniem szczurów Wistar, pochodzących z hodowli Charles River Sulzfeld i hodowanych w zwierzętarni Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN. Do doświadczeń *ex vivo* wykorzystano 7 – dniowe oseski oddzielane od matek bezpośrednio przed procedurą izolacji hipokampów i zakładania hodowli organotypowych. Do doświadczeń *in vivo* wykorzystano dorosłe samce w wieku 2-3 miesięcy, o wadze 250-280g. W trakcie trwania eksperymentu i między wykonywanymi procedurami zwierzęta przebywały w klatkach hodowlanych w fotoperiodzie 13:11 oraz miały nieprzerwany dostęp do pożywienia i wody. W klatkach eksperymentalnych zastosowano wzbogacenie środowiska poprzez dodatkowe wióry o różnej długości i grubości, materiał gniazdowy w postaci bawełnianych płatków i kokonów, klocki do ścierania zębów, umieszczono schronienia/kryjówki. W każdej klatce (wys. 200 mm, wymiary – góra: dł. 5850 mm x szer. 375 mm, powierzchnia podłogi: 1802 cm²) przebywało maksymalnie 6 szczurów. Wszystkie procedury odbywały się zgodnie z wytycznymi Unii Europejskiej i zostały zatwierdzone przez I Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach (nr 620/2018) oraz II Lokalną Komisję Etyczną ds. Doświadczeń na Zwierzętach (nr WAW2/079/2021).

5. Metody badań

5.1. Izolacja mezenchymalnych komórek macierzystych z galarety Whartona sznura pępowinowego

Fragment sznura pępowinowego o długości około 15-20 cm pobrano tuż po porodzie i zanurzono w sterylnej soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS, ang. *Phosphate Buffered Saline*, Gibco) z dodatkiem antybiotyku – penicyliny i streptomycyny (1:100, Gibco) bezpośrednio po pobraniu. Tkanki były w ten sposób transportowane do Zakładu Bioinżynierii Komórek Macierzystych Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, gdzie przystępowano do procedury izolacji i zakładania hodowli pierwotnej.

Sznury pępowinowe krojono poprzecznie skalpelem na odcinki o grubości około 2 mm. Z obszaru galarety Whartona (galaretowatej tkanki łącznej znajdującej się między naczyniami krwionośnymi) wycinano przy pomocy narzędzia do biopsji (Miltex, GmbH) cylindryczne fragmenty tkanki o średnicy 3 mm, które następnie przenoszono do płytek 6-dołkowych. Hodowle prowadzono w warunkach standardowych – 21% O₂ lub 5% O₂ w zamkniętym układzie zapewniającym stałe stężenie tlenu (Xvivo System, BioSpherix) w 1 ml pożywki wzrostowej/dołek o składzie: DMEM (ang. *Dulbecco Modified Eagle Medium*, Macopharma) z dodatkiem 10% ludzkiego lizatu płytkowego (Macopharma), 1 mg/ml glukozy (Sigma-Aldrich), 2 U/ml heparyny (Sigma-Aldrich) oraz antybiotyku i środka przeciwgrzybicznego – AAS (ang. *Antibiotic-Antimycotic Solution*, 1:100, Gibco).

Komórki WJ-MSC, które wymigrowały z fragmentów tkanki, hodowano w warunkach 21% O₂, 5% CO₂ i 37°C lub w systemie zamkniętym BioSpherix: 5% O₂ oraz 5% CO₂ przy 37°C, wymiana pożywki w laminarze w tych samych warunkach: 5% O₂, 5% CO₂, 37°C. Pożywkę wzrostową wymieniało co 2 dni. Gdy komórki osiągnęły 70% konfluencję, hodowle pasażowano stosując roztwór akutazy (*Accutase Cell Detachment Solution*, Becton Dickinson). Zebrane komórki wirowano przez 3 minuty przy 1000 obr./min., a następnie zakładano dalsze hodowle wysiewając komórki w kolejnych pasażach w gęstości 2x10³ komórek/cm².

5.2. Różnicowanie komórek WJ-MSC w linii mezodermalnej

Do przeprowadzenia różnicowania w kierunku mezodermalnym wykorzystano komórki WJ-MSC hodowane w warunkach 21% O₂. Procedury adipogenezy, osteogenezy i chondrogenyzy wykonano zgodnie z zaleceniami producenta w obecności komercyjnych mediów indukujących różnicowanie – STEMPRO® Adipogenesis/Osteogenesis/Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco). Komórki wysiano na szalki 24-dółkowe w gęstości 2x10³ komórek/cm². Przy odpowiedniej konfluencji (50-70% dla osteo- i adipogenezy) wymieniano medium wzrostowe (standardowe medium hodowlane) na pożywkę różnicującą. Różnicowanie w kierunku komórek tkanki chrzęstnej rozpoczęto poprzez zagregowanie za pomocą techniki wiszącej kropli (dla ułatwienia stworzenia agregatów) – w ilości 8x10⁴ komórek/kroplę, a następnie po godzinnej inkubacji przenoszono uzyskane agregaty do dołków szalki 24-dółkowej w medium indukującym różnicowanie. Komórki WJ-MSC hodowano odpowiednio: 14 dni (adipogeneza, chondrogeneza) lub 21 dni (osteogeneza) w komercyjnych pożywkach różnicujących. Po tym czasie hodowle komórkowe płukano roztworem PBS, utrwalano 4% PFA (ang. *Paraformaldehyde*) przez 30 minut, a następnie efekt różnicowania zweryfikowano przy użyciu odpowiednich barwników: czerwieni oleistej (adipocyty), czerwieni alizarynowej (osteocyty) i błękitu alcjanu (chondrocyty).

5.2.1. Adipogeneza

Hodowle komórkowe po utrwaleniu 4% PFA dwukrotnie przepłukiwano wodą destylowaną i nanoszono 60% izopropanol (Merck) na 5 minut. Do wykonania barwienia użyto czerwieni oleistej (Oil Red O, Sigma-Aldrich) oraz 99% izopropanolu w proporcji 3 mg na 1 ml odczynnika. Przygotowany roztwór rozcieńczono wodą destylowaną w stosunku 3:2, a po 10 minutach inkubacji przefiltrowano. Następnie usuwano izopropanol, dodawano przygotowany roztwór barwnika na 5 minut, a następnie przepłukano wodą.

5.2.2. Osteogeneza

Hodowle komórkowe po utrwaleniu 4% PFA dwukrotnie przepłukiwano wodą destylowaną. Do przygotowania 2% barwnika użyto czerwieni alizarynowej (Alizarin Red S, Sigma-Aldrich) oraz wody destylowanej. W celu wybarwienia

komórek naniesiono przygotowany roztwór barwnika na 3 minuty, a następnie trzykrotnie przepłukano wodą destylowaną.

5.2.3. Chondrogeneza

Hodowle komórkowe po utrwaleniu 4% PFA dwukrotnie przepłukiwano wodą destylowaną. Do przygotowania 1% barwnika użyto błękitu alcjanu (Alcian Blue, Sigma-Aldrich) oraz 0,1 N HCl. Po utrwaleniu nanoszono przygotowany roztwór barwnika na 30 minut. Następnie trzykrotnie przepłukiwano dołki 0,1 N HCl oraz raz wodą destylowaną.

5.3. Przygotowanie hydrożelowych skafoldów/rusztowań

W hodowli trójwymiarowej zastosowano dwa różne rodzaje skafoldów/rusztowań. Jeden został wykonany z ludzkiego lizatu płytkowego (LP, Macopharma), a drugi z fibrynogenu pozyskanego z ludzkiego osocza (FB, 5 mg/ml, Sigma-Aldrich). Aktywny czynnik krzepnięcia II (trombina) zastosowano jako czynnik sieciujący do przygotowania obydwu typów skafoldów. Trombina jest glikoproteiną (α 2-globuliną) o właściwościach proteolitycznych zaangażowanych w przekształcanie rozpuszczalnego fibrynogenu w nierozpuszczalną fibrynę. Trombinę (Sigma-Aldrich) rozcieńczono w soli fizjologicznej buforowanej Tris (TBS, Sigma-Aldrich) z dodatkiem chlorku wapnia (CaCl_2 , Sigma-Aldrich) do końcowego stężenia 2 U/ml trombiny i 250 μM CaCl_2 .

Do hodowli trójwymiarowych komórki WJ-MSC przygotowano w następujący sposób: komórki odklecano przy użyciu akutazy, wirowano (1000 obr./min., 3 min.), a następnie zawieszano w roztworze fibrynogenu lub w lizacie płytkowym z dodatkiem inhibitora degradacji fibrynogenu – aprotyniny (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma-Aldrich). Następnie 50 μl roztworu trombiny przeniesiono w postaci kropli na szalkę Petriego i zmieszano z 50 μl komórek zawieszonych w lizacie płytkowym lub fibrynogenu. Każdy skafold zawierał 1×10^4 komórek.

Świeże skafoldy inkubowano przez 1 godzinę w 37°C, 5% CO_2 , 5% lub 21% O_2 . Następnie skafoldy przeniesiono do 6-dołkowych płytek zawierających 2 ml pożywki wzrostowej/dołek. Pożywka hodowlana składała się z DMEM (Macopharma) z dodatkiem 10% ludzkiego lizatu płytkowego (Macopharma), 1 mg/ml glukozy (Sigma-Aldrich), 2 U/ml heparyny (Sigma-Aldrich) i AAS (1:100, Gibco) z dodatkiem inhibitora degradacji fibrynogenu – aprotyniny

w stężeniu 10 µg/ml. Trójwymiarowe hydrożele z komórkami WJ-MSC hodowano jako hodowle pływające. Pożywkę wymieniano co 2-3 dni, dodając każdorazowo 10 µg/ml aprotyniny.

5.4. Analiza tworzenia sieci fibrynowej w skafoldach hydrożelowych

Wewnętrzną strukturę samych skafoldów wyznakowano poprzez dodanie fibrynogenu z ludzkiego osocza sprzężonego z fluorochromem – Alexa Fluor 546 (1:100, Molecular Probes) do przygotowanej frakcji lizatu płytkowego lub fibrynogenu. Skafoldy te wykonano w następujący sposób: trombinę (50 µl) przeniesiono na szkiełko mikroskopowe, zmieszano z 50 µl wyznakowanego lizatu płytkowego lub fibrynogenu, zamknięto szkiełkiem nakrywkowym i inkubowano w 37°C przez 1 godz. Następnie wizualizowano tworzenie sieci fibrynowej w systemie konfokalnym LSM510 (Zeiss). Pomiary średnicy włókna i wielkości porów wykonano za pomocą oprogramowania Zen 2.3 lite (Zeiss).

5.5. Test migracji WJ-MSC w warunkach 3D

Komórki WJ-MSC znakowano przyżyciowo poprzez dodanie 10 mM CMFDA – dioctanu 5-chlorometylofluoresceiny (ThermoFisher Scientific) – znacznika fluorescencyjnego wiążącego się z lipidami błon wewnątrzkomórkowych. CMFDA dodawano do pożywki bezsurowiczej i inkubowano przez 1 godz. w 37°C. Po tym czasie komórki odklejono przy użyciu akutazy, odwirowano (1000 obr./min., 3 min.) i zawieszono w lizacie płytkowym lub w roztworze fibrynogenu.

W celu oceny migracji skafoldy z komórkami przygotowano w następujący sposób: kroplę 50 µl trombiny umieszczono na dnie każdego dołka w 6-dołkowych płytkach, a następnie zmieszano z komórkami zawieszonymi w 50 µl lizatu płytkowego lub fibrynogenu w obecności aprotyniny (10 µg/ml). Po 1 godz. inkubacji w 37°C i 5% CO₂, 21% O₂ lub 5% O₂, do każdego dołka ostrożnie dodano świeżą pożywkę wzrostową z dodatkiem aprotyniny (10 µg/ml) z jednym skafoldem przymocowanym do dna naczynia hodowlanego. Migrację WJ-MSC ze struktury hydrożelu analizowano po 7 dniach przy użyciu mikroskopu kontrastowego i fluorescencyjnego Axio Vert.A1 z aparatem cyfrowym AxioCam MRc5 (Zeiss) i oprogramowaniem Zen 2.3 lite (Zeiss).

5.6. Analiza degradacji skafoldów

Do przygotowania pustych skafoldów FB lub skafoldów z komórkami WJ-MSC użyto dodatkowo fibrynogenu sprzężonego z fluorochromem – Alexa Fluor 546 (1:100). Wyznakowane skafoldy inkubowano w płytkach 96-dołkowych w standardowej pożywce wzrostowej. W 1, 3 i 7 dniu hodowli *in vitro* zebrano pożywkę i zmierzono poziom fluorescencji za pomocą czytnika płytek FLUOstar Omega (BMG LABTECH). Intensywność fluorescencji pożywki zawierającej zdegradowany wyznakowany fibrynogen obliczono w stosunku do poziomu fluorescencji całkowicie rozpuszczonego skafoldu traktowanego enzymem trypsyną (100%).

5.7. Analiza tempa proliferacji WJ-MSC w warunkach 2D i 3D

Tempo proliferacji komórek WJ-MSC hodowanych w warunkach 2D określano przy użyciu odczynnika Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche). Badanie z użyciem WST-1 polega na kolorymetrycznym pomiarze absorbancji. W obecności WST-1, stabilna sól tetrazolowa jest rozkładana do rozpuszczalnego formazanu przez złożony mechanizm komórkowy. Ilość utworzonego barwnika (formazanu) ściśle koreluje z liczbą żywych, aktywnych metabolicznie komórek w hodowli.

Komórki wysiewano na płytki 96-dołkowe w gęstości 2×10^3 komórek/cm². Każdego dnia analizy dodawano 10 µl odczynnika na kolejny dołek i inkubowano przez 2 godz. w warunkach 21% O₂ lub 5% O₂. Przyrost liczby komórek w czasie wyznaczano na podstawie pomiarów absorbancji przy długości fali $\lambda=420$ nm dokonywanych codziennie przez 7 dni przy użyciu czytnika FLUOstar Omega (BMG LABTECH). Liczbę komórek wyznaczono na podstawie wykonanej krzywej wzorcowej.

W celu określenia tempa proliferacji komórek hodowanych w trójwymiarowych układach eksperymentalnych, WJ-MSC hodowane w skafoldach z lizatu płytkowego lub fibrynogenu przenoszono do roztworu kolagenazy NB 4 Standard Grade (Serva) o stężeniu 20 U/ml przygotowanego w PBS, w celu degradacji struktury skafoldu i uwolnienia komórek. Po 30 minutach inkubacji w warunkach 5% CO₂, 21% O₂ lub 5% O₂ w 37°C komórki przemyto dwukrotnie roztworem PBS, a następnie wirowano przez 5 minut przy 1500 obr./min. Usunięto supernatant, a pelet komórkowy zamrożono w -80°C do

dalszej analizie. Materiał do analizy tempa proliferacji zbierano 1 godz. po przygotowaniu skafoldów z komórkami, po 24 godz. oraz po 4 i 7 dniach hodowli.

Tempo proliferacji komórek WJ-MSC hodowanych w skafoldach określano przy użyciu CyQuant Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen) zgodnie z zaleceniami producenta, na podstawie pomiarów fluorescencji oraz w odniesieniu do wyznaczonej krzywej wzorcowej. Do przeprowadzenia analizy pelet komórek rozmrażano w temperaturze pokojowej i zawieszano w 200 μ l przygotowanego buforu do lizy komórek, zawierającego zielony barwnik fluorescencyjny, który wiąże się z komórkowymi kwasami nukleinowymi. Po 5 minutach inkubacji w ciemności próbki przenoszono do płytek 96-dołkowych i mierzono fluorescencję przy długości fali $\lambda=480$ nm z użyciem czytnika płytek FLUOstar Omega (BMG LABTECH).

5.8. Analiza żywotności WJ-MSC w warunkach 3D

Żywotność komórek WJ-MSC hodowanych w hydrożelowych skafoldach z lizatu płytkowego lub fibrynogenu analizowano za pomocą zestawu LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen). Do wykonania analizy jakościowej skafoldy inkubowano w roztworze PBS z dodatkiem kalceiny (calceinAM) w celu wyznakowania żywych komórek i homodimeru etydyny (EthD-1) dla wyznakowania martwych komórek – oba w stężeniu 1:1000. Po 20 minutowej inkubacji bez dostępu światła, skafoldy przełożono do szalek ze szklanym dnem 35/10 mm i świeżą pożywką hodowlaną, a wyznakowane komórki natychmiast obserwowano za pomocą systemu Cell Observer SD z mikroskopem Axio Observer Z.1 (Zeiss). Analizę żywotności komórek WJ-MSC hodowanych w różnych warunkach mikrośrodowiska przeprowadzono 1 godz. po zawieszeniu komórek w skafoldach, a następnie po 24 godz., 48 godz. i 72 godz., z końcową analizą w 7 dniu hodowli *in vitro*.

5.9. Analiza immunocytochemiczna

Komórki WJ-MSC hodowane w warunkach 2D wysiano na szkiełka pokryte poli-L-lizyną. Po uzyskaniu 70% konfluencji, komórki przepłukano roztworem PBS, a następnie utrwalano 4% PFA. Przeprowadzono permeabilizację błony komórkowej przy użyciu 0,1% Triton X-100 (Sigma Aldrich), a następnie niespecyficzne epitopy antygenów zablokowano surowicą kozią i/lub płodową

surowicą bydlęcą, nałożono odpowiednie przeciwciała pierwszorzędowe (**Tabela 1**), inkubowano przez noc w 4°C, oraz zastosowano godziną inkubację z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi w zależności od analizy specyficznych markerów. Do wyznakowania jąder komórkowych użyto roztworu Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich). W celu akwizycji zdjęć preparatów wykorzystano mikroskop fluorescencyjny Axio Vert.A1 z kamerą cyfrową AxioCam MRc5 (Zeiss).

Komórki WJ-MSC hodowane w warunkach 3D utrwalano 4% PFA przez 20 minut w temperaturze pokojowej po 1 i 5 dniach hodowli. Po utrwaleniu skafoldy przepłukano PBS i zanurzono w 30% roztworze sacharozy (Sigma-Aldrich) w celu odwodnienia. W kolejnym etapie skafoldy zanurzono w mieszaninie 7,5% żelatyny (Sigma-Aldrich) i 10% sacharozy, umieszczano na suchym lodzie do momentu polimeryzacji, a następnie przechowywano w temperaturze - 80°C. Zamrożone skafoldy pocięto na 20 µm skrawki za pomocą kriostatu i osadzono na szkiełkach podstawowych pokrytych silanem (Sigma-Aldrich). Aby wyeliminować niespecyficzne wiązania i ułatwić przepuszczalność błony, próbki inkubowano przez 1 godz. w temperaturze pokojowej z 10% surowicą kozią (ThermoFisher Scientific) zawierającą 0,25% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). Po przemyciu PBS skafoldy z komórkami inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi (**Tabela 1**) przez noc w 4°C. Następnego dnia, po przemyciu PBS, komórki inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z fluorochromem przez 1 godz. w temperaturze pokojowej, a następnie trzykrotnie przemywano PBS. Jądra komórkowe wybarwiono 5 µM Hoechst 33258 przez 20 min w temperaturze pokojowej. Obrazy wyznakowanych komórek rejestrowano przy użyciu konfokalnego systemu LSM780 (Zeiss) i mikroskopu fluorescencyjnego Axio Vert.A1 (Zeiss) z aparatem cyfrowym AxioCam MRc5 (Zeiss) i oprogramowaniem Zen 2012 (Zeiss) w Środowiskowym Laboratorium Laserowych Technik Mikroskopowych IMDiK PAN.

Tabela 1. Przeciwciała pierwszorzędowe użyte do analizy immunocytochemicznej.

Przeciwciało	Pochodzenie	Izotyp	Rozcieńczenie	Firma
anty-Nestyna	mysie monoklonalne	IgG1	1:400	Merck
anty- β -Tubulina III	mysie monoklonalne	Ig2b	1:1000	Sigma
anty-NF-200	mysie monoklonalne	IgG1	1:200	Sigma
anty-GFAP	królicze poliklonalne	IgG (H+L)	1:500	Dako

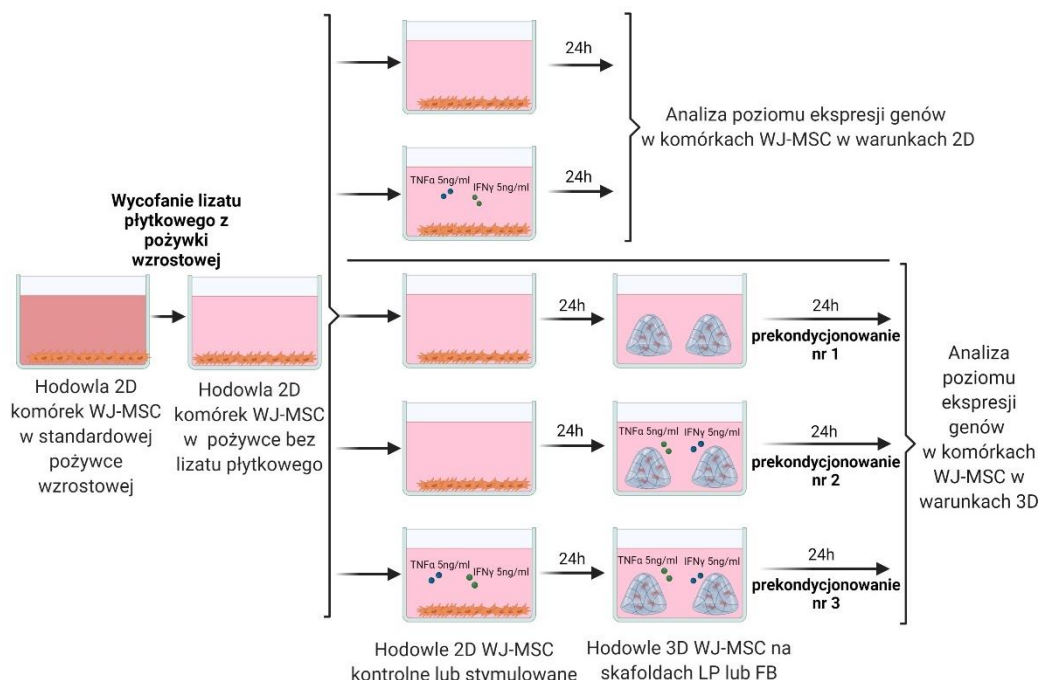
5.10. Stymulacja komórek WJ-MSC czynnikami prozapalnymi

Zastosowano wstępną stymulację komórek WJ-MSC czynnikami prozapalnymi. W tym celu do hodowli komórek dodano mediatory stanu zapalnego: TNF α w stężeniu 5 ng/ml oraz IFN γ w stężeniu 5 ng/ml. Dla określenia odpowiedzi WJ-MSC na działanie tych czynników wykonano analizę poziomu ekspresji cytokin prozapalnych (*IL-6*, *IL-1 β*) i czynników wzrostu (*BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*, *TGF- β 1*) na poziomie mRNA w komórkach hodowanych w 2D oraz w skafoldach LP lub FB w różnych wariantach eksperymentalnych. Hodowle komórek WJ-MSC prowadzono jedynie w warunkach fizjologicznej normoksji (5% O₂), czyli zbliżonych do warunków panujących *in vivo*.

Komórki hodowane w standardowej pożywce wzrostowej płukano roztworem PBS, a następnie dodawano pożywkę wzrostową pozbawioną surowicy (lizatu płytkowego) o składzie: DMEM, glukoza (1 mg/ml), AAS (1:100) z dodatkiem czynników stymulujących TNF α oraz IFN γ i hodowano przez 24 godz. Jako kontrolę zastosowano komórki hodowane w pożywce bez czynników stymulujących. Następnego dnia WJ-MSC odklejono przy użyciu akutazy, wirowano (1000 obr./min, 3 min.), odrzucono supernatant, a pelet komórkowy zawieszono w 400 μ l fenozolu (A&A Biotechnology) do analizy poziomu ekspresji mRNA.

Do otrzymania różnych wariantów eksperymentalnych 3D użyto komórek stymulowanych TNF α 5 ng/ml + IFN γ 5 ng/ml przez 24 godz. i komórek kontrolnych, a następnie hodowano przez kolejne 24 godz. w pożywce

z czynnikami stymulującymi. Jako kontrolę zastosowano komórki hodowane bez czynników stymulujących zarówno w 2D, jak i późniejszej hodowli w skafoldach (Ryc.4).



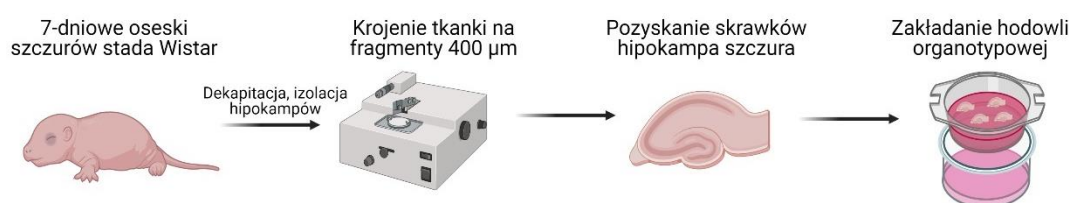
Ryc.4. Schemat przedstawiający przebieg eksperymentu odpowiedzi komórek WJ-MSC na stymulację czynnikami prozapalnymi (TNF α + IFN γ). Wykonano w programie BioRender.

Po 24 godz. inkubacji skafoldy LP i FB z komórkami WJ-MSC poddano trawieniu enzymatycznemu roztworem kolagenazy NB 4 (Serva) w końcowym stężeniu 20 U/ml przygotowanym w PBS. Po 30 minutach inkubacji w 5% O₂, 5% CO₂ i 37°C, komórki przemyto dwukrotnie PBS, wirowano przez 3 minuty przy 1000 obr./min. i zawieszono w 400 μ l fenzolu (A&A Biotechnology) do późniejszej analizy poziomu ekspresji mRNA.

5.11. Hodowla organotypowa skrawków hipokampa szczura

Hodowle organotypowe skrawków hipokampa pozyskiwano od 7-dniowych osesków szczurów Wistar. Zwierzęta usypiano poprzez wprowadzenie w stan głębokiej hipotermii, a następnie dekapitowano i przystępowano do izolacji mózgowia. Wyizolowane hipokampy krojono poprzecznie na 400 μ m fragmenty przy użyciu urządzenia do cięcia tkanek – McIlwain Tissue Chopper (Stoelting).

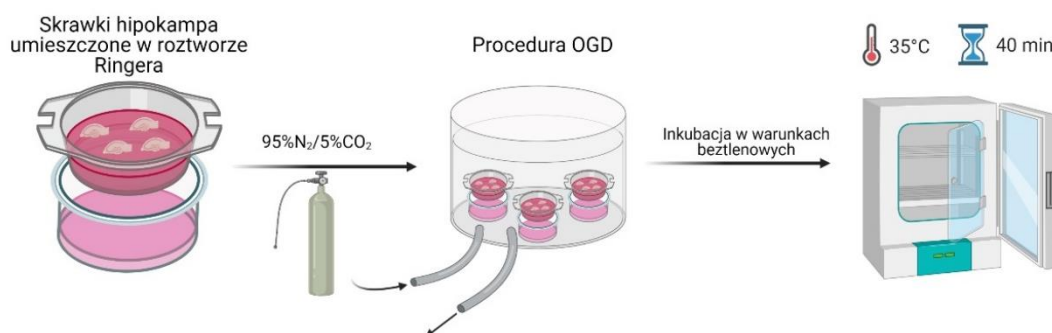
Pozyskane skrawki hipokampa przemyto w PBS, przeniesiono na specjalne membrany półprzepuszczalne (Millicell CM, Millipore) po 4 skrawki/membranę i umieszczono w płytkach 6-dołkowych. Do każdego dołka dodano 0,9 ml pożywki hodowlanej o składzie: DMEM (Gibco), surowica końska (25%; Sigma-Aldrich), 25% HHBSS (ang. *HEPES-Buffered Hanks Balanced Salt Solution*, Gibco), 1 M HEPES (Gibco), 5 mg/ml glukoza (Sigma-Aldrich), antybiotyki (1% amfoterycyna B i 0,4% penicylina-streptomycyna) (Gibco) i umieszczono w inkubatorze o parametrach: 21% O₂, 5% CO₂ i temperaturze 35°C. W ciągu następnych 5 dni hodowli stężenie surowicy stopniowo obniżano, aż do uzyskania pożywki bezsurowicznej zawierającej DMEM (Gibco), HBSS, 1 M HEPES, glukozę i roztwór przeciwbakteryjno-przeciwgrzybiczy (**Ryc.5**). Piątego dnia hodowli skrawki hipokampa poddano działaniu warunków pozbawienia tlenu i glukozy i wykorzystano do dalszych eksperymentów.



Ryc.5. Schemat przedstawiający zakładanie hodowli organotypowej skrawków hipokampa szczura. Wykonano w programie BioRender.

5.12. Procedura OGD (ang. *Oxygen-Glucose Deprivation*) – czasowe pozbawienie tlenu i glukozy imitujące uszkodzenie ischemiczne

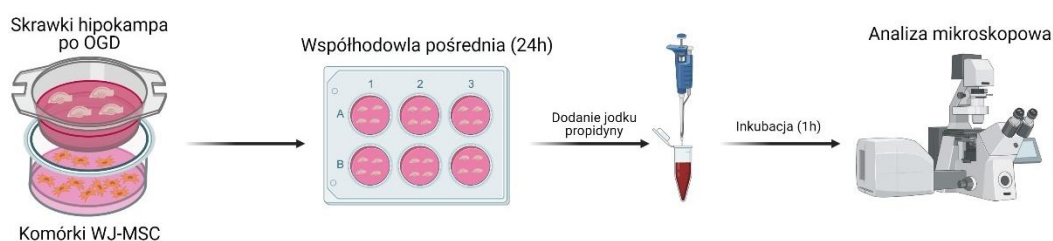
Po 5 dniach hodowli skrawków hipokampa szczura została wykonana procedura OGD imitująca uszkodzenie mózgu w wyniku niedotlenienia. Skrawki hipokampa przepłukano roztworem PBS, a następnie przeniesiono na półprzepuszczalnych membranach hodowlanych do nowych płytek 6-dołkowych wypełnionych roztworem Ringera (Sigma-Aldrich) nasyconego 95% N₂ i 5% CO₂ z dodatkiem 10 mM mannitolu (Sigma-Aldrich). Szalki umieszczono w komorze beztlenowej, a następnie hodowle utrzymywano w atmosferze wolnej od tlenu (95% N₂/5% CO₂) przez 40 minut (**Ryc.6**). Skrawki kontrolne były utrzymywane w standardowych warunkach (21% O₂, 5% CO₂, 35°C).



Ryc.6. Schemat przedstawiający wykonanie procedury OGD – czasowego pozbawienia tlenu i glukozy imitującej ischemiczne uszkodzenie mózgu. Wykonano w programie BioRender.

5.13. Współhodowla WJ-MSC ze skrawkami hipokampa szczura

Bezpośrednio po procedurze OGD skrawki hipokampa przenoszono do płytek 6-dółkowych z umieszczonymi komórkami WJ-MSC w hodowli 2D oraz w skafoldach LP/FB. Skrawki oraz komórki hodowano w tej samej pożywce bezsurowiczej w modelu wykorzystującym współhodowlę pośrednią (brak bezpośredniego kontaktu między komórkami i skrawkami). Śmierć komórek w regionie CA1 hipokampa szczura analizowano po 24 godz. współhodowli z WJ-MSC, aby zweryfikować działanie neuroprotekcijne komórek MSC. W tym celu zastosowano znacznik fluorescencyjny – jodek propidyny w stężeniu 1,4 µg/ml (Sigma-Aldrich). Po 1 godz. inkubacji wyznakowane komórki zliczano wykorzystując mikroskop konfokalny Axio Carl Zeiss LSM 510 oraz oprogramowanie ZEN 2008 (**Ryc.7**). Komórki WJ-MSC z hodowli 2D i 3D po 24 godz. współhodowli z uszkodzonymi skrawkami hipokampa zbierano na analizę poziomu ekspresji genów.

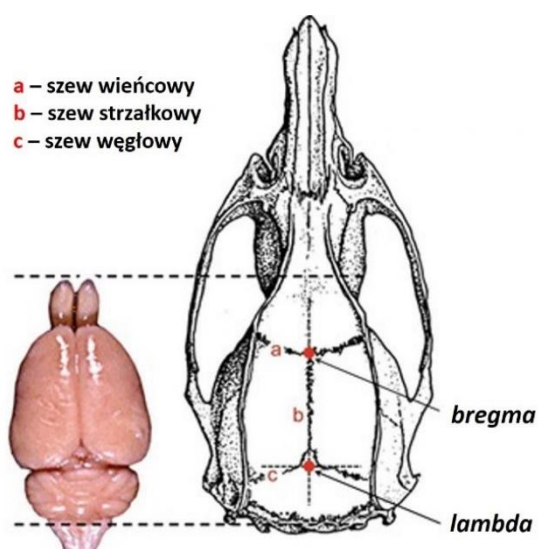


Ryc.7. Schemat przedstawiający zakładanie współhodowli uszkodzonych skrawków hipokampa szczura z komórkami WJ-MSC i późniejszą analizę działania neuroprotekcijnego. Wykonano w programie BioRender.

5.14. Eksperymentalny model uszkodzenia mózgu

Ogniskowe uszkodzenie mózgu szczura wykonano metodą wprowadzoną w IMDiK PAN (Janowski i wsp., 2008), poprzez mikroiniekcję roztworu ośmiowodzianu ouabainy (Sigma-Aldrich) (będącej inhibitorem pompy Na^+/K^+) o stężeniu 5mM przygotowanego w sterylnej soli fizjologicznej. Każdorazowo roztwór sporządzano bezpośrednio przed operacją i do czasu użycia przechowywano w warunkach pozbawionych dostępu światła ze względu na jego światłoczułość.

Szczury Wistar ważono, a następnie usypiano poprzez dootrzewnowe podanie mieszaniny środka znieczulającego i narkozy – 80 mg/kg ketaminy (Bioketan), 2 mg/kg medetomidyny (Domitor) w przeliczeniu na masę ciała zwierzęcia. Po znieczuleniu ogólnym umieszczano zwierzę w aparacie stereotaktycznym (Stoelting) i наносzono na gałki oczne sól fizjologiczną, aby zapobiec ich wysychaniu. Przecinano skórę głowy oraz tkanki miękkie od linii oczu do punktu *lambda*. Po usunięciu błon zaznaczano punkt *bregma* (miejsce przecięcia szwu wieńcowego i strzałkowego, **Ryc.8**).



Ryc.8. Schemat przedstawiający miejsca przecięcia szwów czaszkowych szczura z zaznaczonym punktem *bregma*, będącym miejscem odniesienia do wyznaczenia koordynatów stereotaktycznych. Źródło: Ferry B., Gervasoni D., Vogt C. (2014) *Stereotaxic Approach of a Target Structure*. In: *Stereotaxic Neurosurgery in Laboratory Rodent*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0472-9_4 (ze zmianami).

Dalsze czynności przeprowadzono z użyciem mikroskopu operacyjnego OPMI Pico (Zeiss). Nawiercono otwór trepanacyjny o średnicy 0,5 cm nad prawą

Następnie wycofano igłę z mózgu i zespolono brzegi rany na skórze nicią chirurgiczną (Dafilon, 5/0, 45cm, DS16, Braun). Po zabiegu podano podskórną antybiotyk – enrofloksacynę 5 mg/kg (Baytril) oraz środek przeciwbólowy – meloksykam 5 mg/kg (Metacam). Baytril oraz Metacam podawano przez kolejne 3 dni po przeprowadzonym zabiegu.

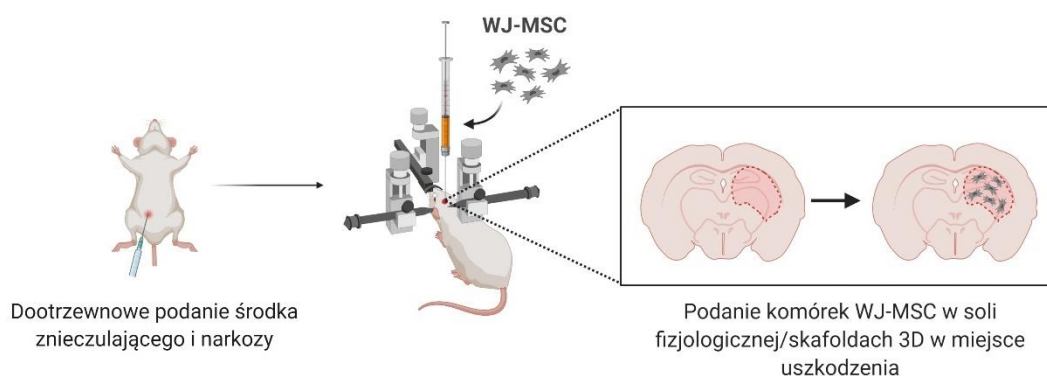
5.15. Transplantacja komórek WJ-MSC do uszkodzonego mózgu szczura

Komórki WJ-MSC na etapie 3-5 pasażu hodowane w warunkach 21% O₂ i 5% O₂ odklejano przy użyciu akutazy, dwukrotnie płukano przy użyciu PBS, wirowano (1000 obr./min., 3 min.), a następnie 5x10⁵ komórek przygotowano do podania do uszkodzonego prążkowania mózgu szczura.

Po 48 godz. od wywołania uszkodzenia mózgu zwierzęta usypiano poprzez dootrzewnowe podanie mieszaniny środka znieczulającego i narkozy – 80 mg/kg ketaminy (Bioketan), 2 mg/kg medetomidyny (Domitor), a następnie umieszczano w aparacie stereotaktycznym (Stoelting). Na gałki oczne nanoszono sól fizjologiczną, aby zapobiec ich wysychaniu. Po dezynfekcji skóry oraz zdjęciu szwów założonych po uprzednio wykonanym uszkodzeniu mózgu przeprowadzono mikroiniekcję (około 30 µl) komórek mezenchymalnych. Komórki WJ-MSC umieszczono w hydrożelowych rusztowaniach z lizatu płytkowego/fibrynogenu lub zawieszono w soli fizjologicznej (2D) i podano do prążkowania prawej półkuli mózgu szczura. Skafoldy przygotowywano bezpośrednio przed podaniem komórek do mózgu szczura. W tym celu 30 µl roztworu trombiny przeniesiono w postaci kropli na szalkę Petriego i zmieszano z 30 µl komórek WJ-MSC zawieszonych w lizacie płytkowym lub fibrynogenu z dodatkiem inhibitora degradacji fibrynogenu – aprotyniny (10 µg/ml). Zawartość przygotowanej w ten sposób mieszaniny niezwłocznie pobierano strzykawką, wprowadzano do mózgu szczura i podawano około połowę objętości, aby zapobiec dostaniu się powietrza. W przypadku podania WJ-MSC w 2D, komórki zawieszano w 60 µl soli fizjologicznej i również podawano połowę objętości.

Komórki przeszczepiono zgodnie z przyjętymi wcześniej koordynatami stereotaktycznymi [A (0,5); L (3,8); V (4,7)] w miejsce uszkodzenia. Kolejnym grupom zwierząt podano puste skafoldy/sól fizjologiczną (warianty eksperymentalne sham), które przygotowano w identyczny sposób, jak w przypadku podawania komórek WJ-MSC (**Ryc.11**). Po przeszczepie powoli

wycofano igłę z mózgu, a następnie zespolono brzegi rany na skórze nicią chirurgiczną. Zwierzętom podano podskórną antybiotyk – enrofloksacynę 5 mg/kg (Baytril) oraz środek przeciwbólowy – meloksykam 5 mg/kg (Metacam). Baytril oraz Metacam były podawane przez kolejne 3 dni po przeprowadzonym zabiegu.



Ryc.11. Schemat przedstawiający podanie komórek WJ-MSC w soli fizjologicznej/hydrożelowych skafoldach do uszkodzonego mózgu szczura. Wykonano w programie BioRender.

5.16. Obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego

W celu zobrazowania transplantowanych komórek przy użyciu rezonansu magnetycznego (MRI) WJ-MSC na etapie 3-5 pasażu wyznakowano przy użyciu nanocząstek tlenku żelaza sprzężonych z rodaminą – Molday ION Rhodamine B (Biopal) w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$ dodawanych bezpośrednio do pożywki na 24 godz. przed podaniem komórek do uszkodzonego mózgu szczura.

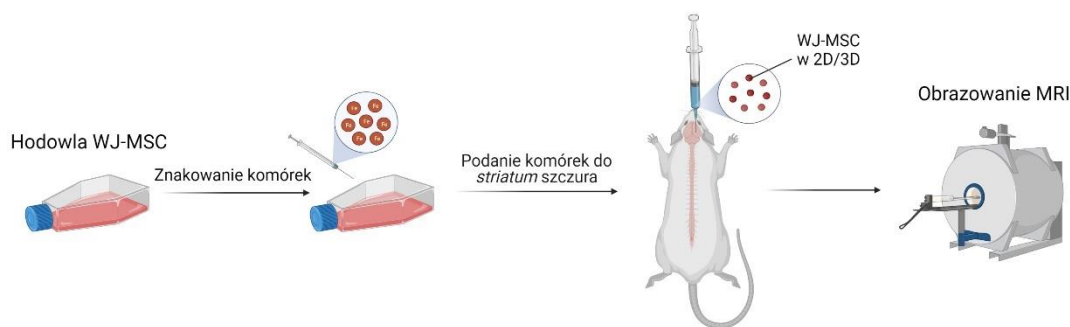
W pierwszym etapie eksperymentu oceniano efektywność znakowania WJ-MSC *in vitro*. Komórki wysiewano na płytki 6-dolkowe, znakowano poprzez dodanie Molday ION Rhodamine B, utrwalano 4% PFA przez 15 minut, płukano trzykrotnie PBS, a następnie wizualizowano przy użyciu mikroskopu kontrastowego i fluorescencyjnego Axio Vert.A1 z aparatem cyfrowym AxioCam MRc5 (Zeiss) i oprogramowaniem Zen 2012 (Zeiss).

Następnie, w celu ustalenia optymalnej liczby komórek, widocznej w obrazowaniu MRI po podaniu do zwierząt, wykonano badanie wstępne przy użyciu fantomu. Polegało ono na określeniu liczby komórek generujących sygnał po zawieszeniu w 200 μl pożywki wzrostowej i umieszczeniu w probówkach do PCR. Do pomiaru sygnału użyto komórki w ilości: 1×10^5 , 5×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 oraz 4×10^6 znakowanych przez 24 godz. Następnie, w celu stabilizacji probówek oraz

aby zapobiec artefaktom powodowanym przez powietrze zastosowano fantom (pojemnik wypełniony 1% żelem agarozowym). Probówki umieszczone w fantomie zostały poddane obrazowaniu w rezonansie magnetycznym (Biospec 70/30USR 7T, Bruker). Optymalny sygnał uzyskano dla próbki zawierającej 5×10^5 komórek i taką liczbę komórek użyto w dalszych etapach eksperymentu.

Komórki WJ-MSC przed podaniem do zwierząt odklejano przy użyciu akutazy, dwukrotnie płukano przy użyciu PBS, wirowano (1000 obr./min., 3 min.), a następnie 5×10^5 komórek przygotowano do podania do uszkodzonego prążkowania mózgu szczura. Komórki podano w postaci zawiesiny w soli fizjologicznej (2D), a także w skafoldach wykonanych z lizatu płytkowego (LP) i fibrynogenu (FB). Obrazowaniu poddano również zwierzęta kontrolne oraz po uszkodzeniu mózgu, którym nie zostały podane komórki WJ-MSC. Dodatkowo wykonano obrazowania mózgowia zwierząt, którym zostały podane: sama sól fizjologiczna lub pusty skafold LP/FB (sham).

Obrazowanie mózgu metodą rezonansu magnetycznego przeprowadzono za pomocą systemu Bruker BioSpec 70/30 Avance III 7T, wyposażonego w nadawczą cylindryczną cewkę o częstotliwości radiowej (8,6 cm średnicy wewnętrznej) i cewkę macierzową dedykowaną tylko do odbioru mózgu szczura (2x2 elementy) umieszczoną nad głową zwierzęcia. Szczury po uszkodzeniu mózgu i przeszczepie WJ-MSC w zawiesinie z soli fizjologicznej (2D) lub w hydrożelach (rusztowania FB lub LP) skanowano w różnych punktach czasowych: 24 godz., 7, 14 i 21 dni po przeszczepie (**Ryc.12**). Zwierzęta znieczulano izofluranem (4% do indukcji, 1,5–2% w tlenie do podtrzymania, dostarczany przez maskę) i umieszczano na łóżku skaningowym w pozycji leżącej z głową umocowaną w aparacie stereotaktycznym z plastikowymi elementami na zęby i uszy (Bruker). Częstotliwość oddechów i temperaturę ciała kontrolowano w trakcie eksperymentu za pomocą systemu monitorowania małych zwierząt (SA Instruments). Wykonano skany pozycjonujące, a następnie wysokorozdzielczy skan strukturalny TurboRARE T2-zależny w przekroju poprzecznym (TR/TE_{eff} = 5000/30 ms, współczynnik RARE = 4) oraz obrazowanie zależne od dyfuzji (DWI, ang. *Diffusion-Weighted Imaging*) – TR/TE_{eff} = 3750/33 ms, 30 kierunków dyfuzji.



Ryc.12. Schemat przedstawiający podanie komórek WJ-MSC znakowanych nanocząstkami tlenku żelaza sprzężonymi z rodaminą B do uszkodzonego mózgu szczura w celu ich wizualizacji podczas obrazowania metodą rezonansu magnetycznego. Wykonano w programie BioRender.

5.17. Analiza wielkości uszkodzenia mózgu szczura

Pomiary mózgowia zwierząt wykonano w programie 3D Slicer v. 4.11.20210226 (<https://www.slicer.org/>). Dokonywano pomiarów powierzchni całej uszkodzonej półkuli oraz wielkości uszkodzenia mózgu wywołanego ouabainą wyrażonych w mm^3 , a następnie wyznaczono procent powierzchni półkuli, który uległ cytotoksycznemu uszkodzeniu względem całej półkuli. Analizowano mózgowia zwierząt po uszkodzeniu ogniskowym oraz w następstwie podania komórek WJ-MSC w 2D oraz skafoldach, a także po podaniu samej soli fizjologicznej/pustych skafoldów (sham) w kolejnych punktach czasowych (po 24 godz., 7, 14 i 21 dniach od podania).

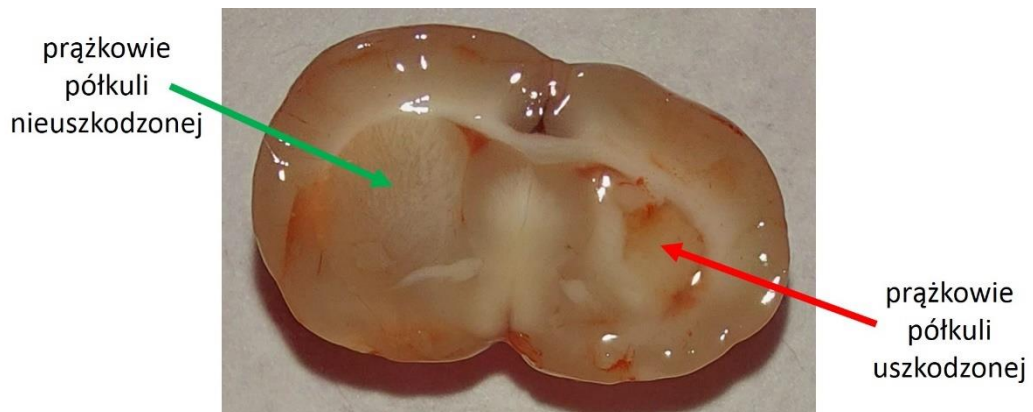
5.18. Pobranie materiału do badań

5.18.1. Pobranie płynu mózgowo-rdzeniowego

W określonym dniu eksperymentu szczury usypiano poprzez dootrzewnowe podanie mieszaniny środka znieczulającego i narkozy – 80 mg/kg ketaminy (Bioketan), 2 mg/kg medetomidyny (Domitor) stosownie do masy ciała zwierzęcia. Po znieczuleniu umieszczano szczura w aparacie stereotaktycznym (Stoelting) z ustawieniem głowy pod kątem 45° , dezynfekowano skórę i wprowadzano igłę w błonę szczytowo-potyliczną przednią pomiędzy częścią podstawną kości potylicznej a łukiem przednim kręgu szczytowego. Płyn mózgowo-rdzeniowy (około 100-150 μl) pobierano strzykawką ze zbiornika mózdkowo-rdzeniowego (*cisterna magna*) i przechowywano w temperaturze -80°C do późniejszej analizy.

5.18.2. Pobranie poszczególnych struktur mózgowia

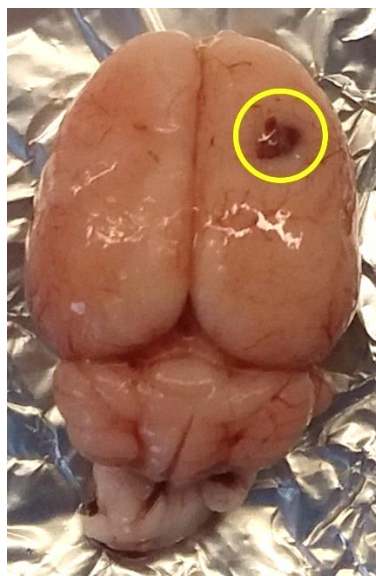
Zwierzęta uśmiercano poprzez dekapitację, a następnie przystępowano do izolacji mózgowia. Mózgi zwierząt cięto skalpelem w płaszczyźnie poprzecznej w 1/3 długości i do dalszej analizy pobierano prążkowie z uszkodzonej półkuli mózgu (**Ryc.13**). Tkanki zamrażano na suchym lodzie, a następnie przechowywano w temperaturze -80°C do późniejszej analizy poziomu ekspresji genów.



Ryc.13. Zdjęcie przedstawiające mózg szczura w przekroju poprzecznym. Po lewej stronie zaznaczone prążkowie nieuszkodzonej półkuli (zielony), zaś po prawej widoczne jest prążkowie po uszkodzeniu mózgu indukowanym ouabainą (czerwony).

5.18.3. Pobranie całego mózgowia

Zwierzęta uśmiercano poprzez dekapitację, a następnie przystępowano do izolacji mózgowia (**Ryc.14**). Całe mózgi zwierząt umieszczano w probówce typu falcon o pojemności 50 ml wypełnionej 4% PFA i pozostawiano na 24 godz. w temperaturze 4°C. Następnego dnia mózgi umieszczano w roztworze 30% sacharozy z dodatkiem 0,1% azydku sodu (Sigma-Aldrich). Po upływie 24 godz. mózgi mrożono na suchym lodzie i przechowywano w temperaturze -80°C do późniejszej analizy immunohistochemicznej.



Ryc.14. Zdjęcie przedstawiające wyizolowany mózg szczura z wyraźnie widocznym miejscem uszkodzenia prawej półkuli w następstwie stereotaktycznego podania ouabainy do prążkowiec.

5.19. Izolacja RNA

Ekspresję genów na poziomie mRNA obliczono i przeanalizowano z próbek WJ-MSC pochodzących od trzech niezależnych dawców i przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Do izolacji mRNA zastosowano odczynnik Fenzol (A&A Biotechnology).

Komórki hodowane w warunkach 2D odklejano przy użyciu akutazy, wirowano (1000 obr./min., 3 min.), a następnie pelet komórek zawieszano w 400 μ l fenozolu.

Komórki WJ-MSC hodowane w skafoldach z lizatu płytkowego lub fibrynogenu przenoszono do roztworu kolagenazy NB 4 Standard Grade (Serva) o stężeniu 20 U/ml przygotowanego w PBS w celu degradacji struktury skafoldu. Po 30 minutach inkubacji w warunkach 5% CO₂, 37°C oraz 21% O₂ lub 5% O₂ komórki przemyto dwukrotnie roztworem PBS, a następnie wirowano przez 5 minut przy 1500 obr./min. Usunięto supernatant, a pelet komórkowy zawieszano w 400 μ l fenozolu.

Pobrane od zwierząt prążkowiec mózgu trzymano na suchym lodzie. Następnie dodawano 400 μ l fenozolu i homogenizowano z użyciem ręcznego homogenizatora.

Tak przygotowane próbki (pozyskane z komórek hodowanych w warunkach 2D, 3D oraz z prążkowiec) inkubowano przez 5 minut w temperaturze

50°C. Następnie dodawano 150 µl wody jałowej, wortexowano przez 15 sekund, inkubowano przez 5 minut i wirowano przez 15 minut przy 12000 obr./min. Po zwirowaniu pobierano 400 µl supernatantu do nowych probówek, dodawano 400 µl izopropanolu i przenoszono na kolumny do izolacji RNA. Próbkę wirowano przez 1 min przy 12000 obr./min., a następnie kolumny przenoszono do nowych probówek i dodawano 700 µl roztworu płuczającego. Po zwirowaniu (1 min., 12000 obr./min.) czynność tę powtórzono. Następnie usuwano przesącz, kolumny umieszczano w tych samych probówkach, dodawano 300 µl roztworu płuczającego i wirowano (2 min., 12000 obr./min.). Kolumny umieszczano w nowych probówkach, dodawano 50 µl wody jałowej, inkubowano przez 2 minuty i wirowano (1 min., 12000 obr./min.). Kolumny wyrzucano, a mRNA znajdujące się w przesączu przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych analiz.

Każdą próbkę przygotowanego materiału traktowano 1U/ml DNazy (Clean-Up RNA Concentrator, A&A Biotechnology) w celu usunięcia pozostałości DNA. Do próbek mRNA zawieszonych w 50 µl wody jałowej dodawano 2 µl DNazy, 12 µl 10x buforu do DNazy i uzupełniano wodą jałową do objętości 120 µl. Próbkę inkubowano przez 15 minut w temperaturze 37°C, a następnie dodawano 600 µl buforu usuwającego DNazy, całość nanoszono na mikrokolumny i wirowano (1 min., 10000 obr./min.). Po zwirowaniu kolumny umieszczano w nowych probówkach, dodawano 600 µl roztworu płuczającego i wirowano (1 min., 10000 obr./min.). Następnie usuwano przesącz, kolumny umieszczano w tych samych probówkach, dodawano 400 µl roztworu płuczającego i wirowano (2 min., 10000 obr./min.). Kolumny umieszczano w nowych, wolnych od RNAzy probówkach elucyjnych i do złoza znajdującego się na dnie mikrokolumny dodawano po 20 µl wody jałowej. Próbkę inkubowano przez 2 minuty, wirowano (1 min., 10000 obr./min.), usuwano kolumny, a oczyszczone mRNA znajdujące się w przesączu przechowywano w temperaturze -80°C do dalszych analiz.

Czystość otrzymanego mRNA oceniano przez odczyt absorbancji z użyciem spektrofotometru NanoDrop One Microvolume UV-Vis (ThermoFisher Scientific).

5.20. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Do przeprowadzenia reakcji odwrotnej transkrypcji używano zestawu High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) zawierającego odwrotną transkryptazę. Pobierano odpowiednią ilość roztworu RNA, w której znajdowało

się 1000 ng kwasu nukleinowego, po czym uzupełniano wodą wolną od nukleaz do objętości 9 μ l. Następnie dodawano po 10 μ l 2X RT Buffer oraz 1 μ l 20X Enzyme Mix. Reakcję przeprowadzano z użyciem termocyklera (Eppendorf) przez 60 minut w 37°C. Zatrzymanie reakcji następowało poprzez ogrzanie próbek do 95°C przez 5 minut oraz ich schłodzenie do temperatury 4°C. Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawia poniższa tabela:

Tabela 2. Skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji odwrotnej transkrypcji.

Odczynnik	Ilość
RNA	X μ l
Woda wolna od nukleaz	9-X μ l
2X RT Buffer Mix	10 μ l
20X RT Enzyme Mix	1 μ l
Razem	20 μl

Profil termiczny reakcji:

- 1) 37°C przez 60 minut – właściwa reakcja
- 2) 95°C przez 5 minut – zatrzymanie reakcji
- 3) 4°C – schłodzenie próbek

5.21. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

Ilościową reakcję łańcuchową polimerazy przeprowadzono z użyciem odczynnika SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies), który wiąże się z dwuniciowym DNA i starterów specyficznych dla genów wymienionych w **Tabeli 4** i **5** – odpowiednio genów ludzkich i szczurzych. Reakcję przeprowadzono w termocyklerze 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems). Poziom ekspresji β -aktyny (*ACTB*) zastosowano jako gen referencyjny dla komórek WJ-MSC, zaś *GAPDH* jako kontrolę dla wyliczenia poziomu ekspresji genów szczurzych.

Wyniki wyrażono jako znormalizowaną x-krotność ekspresji dla każdego genu, a wartości przedstawiono w odniesieniu do poziomu ekspresji w komórkach hodowanych w warunkach kontrolnych 2D. W przypadku markerów szczurzych

jako kalibratora użyto wartości poziomu ekspresji genów w uszkodzonym mózgu szczura (OUA), gdzie nie wykonano transplantacji komórek WJ-MSC ani podania pustych skafoldów/soli fizjologicznej (sham).

Na podstawie uzyskanych wyników obliczano względny poziom ekspresji poszczególnych markerów w komórkach WJ-MSC hodowanych w różnych warunkach tlenowych i przestrzennych, a także w tkance pobranej z mózgów szczurów korzystając z następujących wzorów:

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

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

$$\text{Ratio: } 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Tabela 3. Skład mieszaniny reakcyjnej w reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

Odczynnik	Ilość
cDNA	X µl
Woda wolna od nukleaz	4-X µl
SYBR Green PCR Master Mix	5 µl
startery	1 µl
Razem	10 µl

Profil termiczny reakcji:

- 1) 50°C przez 2 minuty
 - 2) 95°C przez 10 minut
 - 3) 95°C przez 15 sekund
 - 4) 60°C przez 1 minutę
 - 5) 4°C – ∞
- } x40 cykli

Tabela 4. Sekwencje starterów dla genów ludzkich użyte do reakcji PCR w czasie rzeczywistym w badaniach *in vitro* oraz *ex vivo*.

Gen	Wielkość produktu	Sekwencja (5'→3')
ACTB	120 pz	F: GCCAACCGCGAGAAGATGA R: CATCACGATGCCAGTGGTA
BDNF	80 pz	F: ATTACAATCAGATGGGCCACATG R: AGGGAGAAAGCAGAAACAAGACA
GNDF	92 pz	F: TTTAGGTAAGTGCAGCGGCTCTT R: TCACTCACCAGCCTTCTATTTCTG
VEGF-A	91 pz	F: ATGACGAGGGCCTGGAGTGTG R: CCTATGTGCTGGCCTTGGTGAG
TGF-β1	101 pz	F: CCCAGCATCTGCAAAGCTC R: GTCAATGTACAGCTGCCGCA
IL-6	81 pz	F: GGTACATCCTCGACGGCATCT R: GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC
IL-1β	129 pz	F: GGGACAGGATATGGAGCAACA R: TCTTTCAACACGCAGGACAG
Nestyna	169 pz	F: TGGCTCAGAGGAAGAGTCTGA R: TCCCCCATTTACATGCTGTGA
β-Tubulina III	159 pz	F: CTCAGGGGCCTTGGACATC R: CAGGCAGTCGCAGTTTTTCAC
NF-200	160 pz	F: GAGGAACACCAAGTGGGAGA R: TTCTGGAAGCGAGAAAGGAA
GFAP	266 pz	F: GCAGAGATGATGGAGCTCAATGACC R: GTTTCATCCTGGAGCTTCTGCCTCA
IDO-1	233 pz	F: CAAAGGTCATGGAGATGTCC R: CCACCAATAGAGAGACCAGG
TSG-6	64 pz	F: GGCCATCTCGCAACTTACA R: CAGCACAGACATGAAATCCAA

Tabela 5. Sekwencje starterów dla genów szczurzych użyte do reakcji PCR w czasie rzeczywistym w badaniach *in vivo*.

Gen	Wielkość produktu	Sekwencja (5'→3')
GAPDH	81 pz	F: AAGATGGTGAAGGTCGGTGT R: CACTTTGTCACAAGAGAAGGCA
BDNF	171 pz	F: AGGAGCGTGACAACAATGTGA R: CTTGTCCGTGGACGTTTGC
GDNF	110 pz	F: CGCCGGTAAGAGGCTTCTCG R: GGTCAGGATAATCTTCGGGCAT
VEGF-A	80 pz	F: CACTGGACCCTGGCTTTACTG R: TTCTGCTCCCCTTCTGTCTG
TGF-β1	100 pz	F: TGCTAATGGTGGACCGCAAC R: ACTGCTTCCCGAATGTCTGA
IL-6	135 pz	F: CCACCCACAACAGACCAGTA R: ACAGTGCATCATCGCTGTTC
IL-1β	121 pz	F: GTCTGACCCATGTGAGCTGAA R: CAAGGCCACAGGGATTTTGTC

5.22. Analiza immunoenzymatyczna

Oznaczenia wykonano w płynie mózgowo-rdzeniowym pobranym od szczurów kontrolnych, po uszkodzeniu ogniskowym, podaniu WJ-MSK w 2D lub 3D LP/3D FB oraz podaniu soli fizjologicznej/pustych skafoldów (sham) po 24 godz., 7, 14 i 21 dniach. Do analizy użyto dwukrotnie rozcieńzonego płynu mózgowo-rdzeniowego. Do analizy stężenia neurotrofin (BDNF oraz GDNF) w płynie mózgowo-rdzeniowym szczura wykorzystano zestawy Rat BDNF ELISA Kit (Sigma-Aldrich) oraz Rat GDNF ELISA Kit (Sigma-Aldrich).

W pierwszej kolejności przygotowano odpowiednie rozcieńczenia do wykonania krzywych standardowych zgodnie z zaleceniami producenta oraz nałożono badane próbki w objętości 100 µl/dołek na płytki pokryte przeciwciałem skierowanym przeciwko szczurzemu BDNF lub GDNF. Płytki zaklejono i inkubowano przez 2,5 godz. w temperaturze pokojowej z jednoczesnym delikatnym wytrząsaniem (65 obr./min.). Następnie płytki czterokrotnie przepłukano buforem płuczającym, nałożono po 100 µl/dołek odczynnika do detekcji

przeciwciał i inkubowano przez 1 godz. w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem 65 obr./min. Płytki ponownie płukano czterokrotnie buforem płuczającym, nałożono po 100 μ l/dołek roztworu streptawidyny sprzężonej z peroksydazą chrzanową i inkubowano przez 45 minut w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem 65 obr./min. Po skończonej inkubacji płytki płukano czterokrotnie buforem płuczającym, a następnie dodano po 100 μ l/dołek odczynnika TMB (3,3',5,5'-tetrametylobenzzydiny), będącego substratem dla peroksydazy chrzanowej. Płytki inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem 65 obr./min., chroniąc przed światłem. W ostatnim etapie dodano po 50 μ l/dołek roztworu do zatrzymania reakcji i natychmiastowo mierzono pomiar absorbancji przy długości fali 450 nm za pomocą czytnika płytek FLUOstar Omega.

Do analizy stężenia VEGF-A, IL-6 oraz IL-1 β wykorzystano zestawy Rat Premixed Multi-Analyte Kit (R&D Systems). W pierwszej kolejności przygotowano odpowiednie rozcieńczenia do wykonania krzywych standardowych zgodnie z zaleceniami producenta oraz nałożono badane próbki w objętości 50 μ l/dołek. Następnie przygotowano odpowiednie rozcieńczenie mikrokulek magnetycznych i dodano po 50 μ l/dołek do wcześniej nałożonych próbek badanych oraz standardów i prób ślepych. Płytki zaklejono i inkubowano przez 2 godz. w temperaturze pokojowej na wytrząsarce orbitalnej przy 800 obr./min. Następnie płytki przymocowano do urządzenia magnetycznego zapewniającego adhezję kulek do dna płytki i trzykrotnie przepłukano buforem płuczającym. Przygotowano odpowiednie rozcieńczenie mieszaniny przeciwciał biotynylowanych i dodano po 50 μ l/dołek. Następnie płytki zaklejono i inkubowano przez 1 godz. w temperaturze pokojowej na wytrząsarce orbitalnej przy 800 obr./min. Po inkubacji dołki przepłukano trzykrotnie buforem płuczającym. Kolejno przygotowano odpowiednie rozcieńczenie streptawidyny – fikoerytryny (PE) i dodano po 50 μ l/dołek. Płytki zaklejono i inkubowano przez 30 min. w temperaturze pokojowej na wytrząsarce orbitalnej przy 800 obr./min. Po inkubacji dołki przepłukano trzykrotnie buforem płuczającym. Kolejno nałożono na płytkę po 100 μ l/dołek roztworu płuczającego, inkubowano przez 2 min. w temperaturze pokojowej na wytrząsarce orbitalnej przy 800 obr./min. W ostatnim etapie przeprowadzono pomiar stężenia badanych analitów przy użyciu systemu Bio-Plex 200 (Bio-Rad).

W przypadku analizy stężenia TGF- β 1 wykorzystano zestawy Bio-Plex Pro TGF- β Assays (Bio-Rad). Do wszystkich analizowanych próbek dodano najpierw

1N HCl w proporcji 1:5 w celu aktywacji badanego czynnika, następnie po 10 minutach inkubacji dodano 1,2N NaOH/0,5M HEPES w celu neutralizacji działania kwasu i dwukrotnie rozcieńczono próbki odpowiednim buforem. Następnie przygotowano rozcieńczenie mikrokulek magnetycznych i dodano po 50 μ l/dołek. Płytki przymocowano do urządzenia magnetycznego zapewniającego adhezję kulek do dna płytki i dwukrotnie przepłukano buforem płuczającym. Kolejno przygotowano odpowiednie rozcieńczenia próbek do wykonania krzywych standardowych zgodnie z zaleceniami producenta oraz nałożono badane próbki w objętości 50 μ l/dołek. Płytki zaklejono i inkubowano przez 2 godz. w temperaturze pokojowej na wytrząsarce orbitalnej przy 850 obr./min. Po inkubacji dołki przepłukano trzykrotnie buforem płuczającym. Następnie przygotowano odpowiednie rozcieńczenie mieszaniny przeciwciał biotynyloowanych i dodano po 25 μ l/dołek. Płytki zaklejono i inkubowano przez 1 godz. w temperaturze pokojowej na wytrząsarce orbitalnej przy 850 obr./min. Po inkubacji dołki przepłukano trzykrotnie buforem płuczającym. Kolejno przygotowano odpowiednie rozcieńczenie streptawidyny – fikoerytryny (PE) i dodano po 50 μ l/dołek. Płytki zaklejono i inkubowano przez 30 min. w temperaturze pokojowej na wytrząsarce orbitalnej przy 850 obr./min. Po inkubacji dołki przepłukano trzykrotnie buforem płuczającym. Kolejno nałożono na płytkę po 125 μ l/dołek buforu, inkubowano przez 30 sekund w temperaturze pokojowej na wytrząsarce orbitalnej przy 850 obr./min. W ostatnim etapie przeprowadzono pomiar stężenia TGF- β 1 przy użyciu systemu Bio-Plex 200 (Bio-Rad).

5.23. Analiza immunohistochemiczna miejsca uszkodzenia

Komórki WJ-MSK przed podaniem do prądkowia mózgu szczurów znakowano nanocząstkami tlenku żelaza – Molday ION Rhodamine B (20 μ g/ml). Po zakończeniu doświadczeń z wykorzystaniem obrazowania metodą rezonansu magnetycznego zwierzęta dekapitowano i pobierano całe mózgowia. Materiał zebrano od szczurów po podaniu komórek w soli fizjologicznej oraz skafoldach LP i FB 21 dni po przeszczepie do uszkodzonego prądkowia. Do czasu analizy immunohistochemicznej mózgi przechowywano w warunkach -80°C po ich uprzednim utrwaleniu w 4% PFA (24 godz., 4°C) i odwodnieniu tkanki w 30% roztworze sacharozy z dodatkiem 0,1% azydku sodu (24 godz., 4°C).

Na 24 godz. przed przystąpieniem do procedury krojenia mózgow tkanę przenoszono do temperatury -20°C . Następnie zamrożone mózgi cięto na $20\ \mu\text{m}$ skrawki za pomocą kriostatu i osadzano na szkiełkach podstawowych pokrytych silanem. Przygotowane preparaty przechowywano do dalszych eksperymentów w temperaturze -80°C .

Przed przystąpieniem do barwień immunohistochemicznych preparaty suszono przez 15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie utrwalono 4% PFA przez 20 minut i trzykrotnie przemywano PBS. Jądra komórkowe wybarwiono $5\ \mu\text{M}$ Hoechst 33258 przez 20 minut. Po płukaniu roztworem PBS, preparaty zamykano przy użyciu Fluorescent Mounting Medium (Dako). Obrazy wykonano przy użyciu konfokalnego systemu LSM780 (Zeiss), systemu Cell Observer SD (Zeiss) wyposażonego w mikroskop Axio Observer Z.1 i oprogramowania Zen 2012 (Zeiss) w Środowiskowym Laboratorium Laserowych Techniek Mikroskopowych IMDiK PAN.

5.24. Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki przedstawiono jako wartość średnią \pm odchylenie standardowe. Dane pochodzą z 3-5 niezależnych izolacji przy minimum 3 powtórzeniach w ramach jednego eksperymentu. Analizę statystyczną wykonano w programie GraphPad Prism 8 przy użyciu testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) oraz testu wielokrotnych powtórzeń Tukey'a, testu t-Studenta lub nieparametrycznego testu Manna-Whitney'a w przypadku braku normalności rozkładu dla porównania dwóch grup. Wyniki były uznawane za istotne statystycznie, gdy $p < 0,05$. Poziom istotności statystycznej przedstawiono jako: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

5.25. Etapy badań i grupy badane

Prace eksperymentalne zostały podzielone na trzy etapy: 1) *in vitro*, 2) *ex vivo* i 3) *in vivo*.

1) Charakterystyka WJ-MSC hodowanych w różnych warunkach mikrośrodowiska in vitro

- Określenie struktury utworzonego rusztowania – znakowanie sieci fibrynowej w zastosowanych w hodowli hydrożelowych skafoldach

- Określenie przeżywalności komórek WJ-MSC hodowanych w różnych warunkach przestrzennych i tlenowych
- Analiza migracji, proliferacji i różnicowania neuralnego komórek WJ-MSC hodowanych w warunkach 5% O₂ i 21% O₂ w 2D i skafoldach LP i FB
- Analiza poziomu ekspresji na poziomie mRNA wybranych cytokin, czynników wzrostu, markerów neuralnych w WJ-MSC w różnych warunkach przestrzennych i tlenowych
- Analiza odpowiedzi komórek WJ-MSC na czynniki prozapalne – zastosowanie stymulacji komórek z użyciem cytokin TNF α i IFN γ

2) *Interakcja WJ-MSC z tkanką nerwową w układzie ex vivo:*

- Ocena działania neuroprotekcynnego komórek WJ-MSC hodowanych w różnych warunkach przestrzennych i tlenowych
- Analiza ekspresji wybranych neurotrofin, czynników wzrostu, cytokin pro- i przeciwzapalnych w WJ-MSC hodowanych w warunkach 2D i 3D po współhodowli z uszkodzoną tkanką nerwową szczura

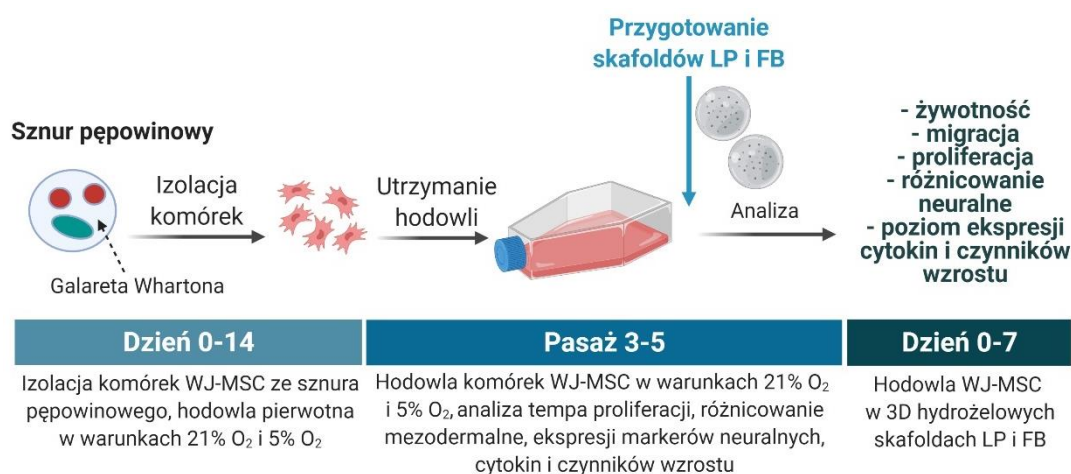
3) *Ocena potencjału terapeutycznego WJ-MSC po podaniu do uszkodzonego mózgu szczura*

- Ustalenie najmniejszej liczby komórek niezbędnej do otrzymania sygnału w badaniach metodą rezonansu magnetycznego – badania z użyciem fantomu
- Analiza zasiedlania uszkodzonej tkanki przez komórki WJ-MSC – obrazowanie MRI szczurów po uszkodzeniu mózgu oraz przeszczepie komórek WJ-MSC osadzonych w różnym mikrośrodowisku
- Określenie zmian wielkości uszkodzenia mózgu oraz analiza dyfuzji cząsteczek wody w obrębie uszkodzonej tkanki w wybranych punktach czasowych po podaniu materiału terapeutycznego
- Określenie odpowiedzi organizmu biorcy na zastosowane podejście terapeutyczne – analiza poziomu ekspresji szczurzych neurotrofin, cytokin pro- i przeciwzapalnych na poziomie mRNA oraz w płynie mózgowo-rdzeniowym w wybranych punktach czasowych od podania komórek WJ-MSC hodowanych w różnych warunkach mikrośrodowiska

W badaniach *in vitro* grupy eksperymentalne stanowiły komórki WJ-MSC hodowane w różnych warunkach tlenowych (21% O₂ lub 5% O₂) i przestrzennych (2D lub hydrożelowe skafoldy) (**Ryc.15**). W badaniach *ex vivo* grupy eksperymentalne stanowiły organotypowe skrawki hipokampa szczura (OHC) uszkodzone w wyniku czasowego niedoboru tlenu i glukozy (OGD), a następnie hodowane z komórkami WJ-MSC (**Ryc.16**). W badaniach *in vivo* grupy eksperymentalne stanowiły szczury poddane uszkodzeniu mózgu indukowanemu ouabainą (OUA), którym podano komórki WJ-MSC w 2D lub 3D lub sól fizjologiczną/pusty skafold w miejsce lezji (do *striatum*) (**Ryc.17**).

Doświadczenia in vitro:

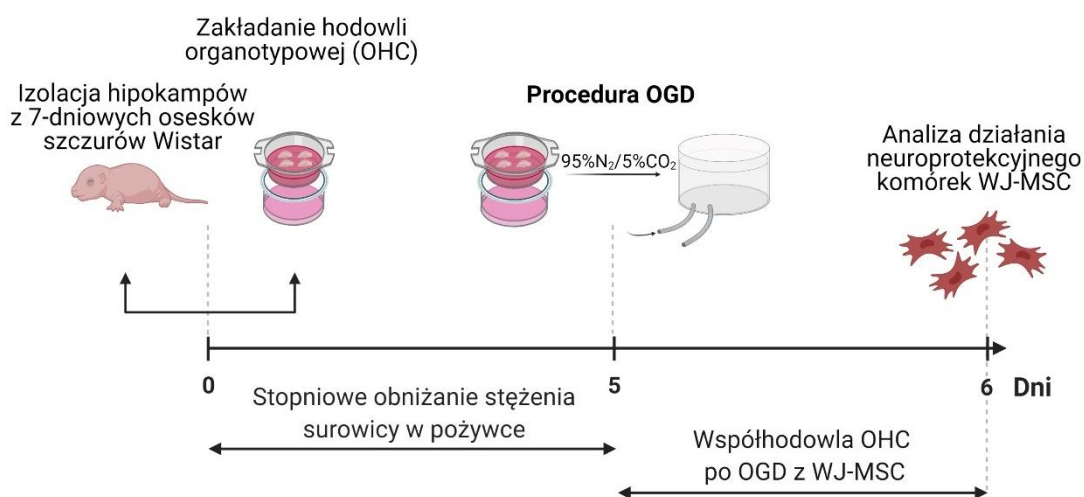
- komórki WJ-MSC hodowane w 2D w warunkach 21% O₂
- komórki WJ-MSC hodowane w 2D warunkach 5% O₂ (fizjologiczna normoksja)
- komórki WJ-MSC hodowane w skafoldach z lizatu płytkowego (LP) w warunkach 21% O₂
- komórki WJ-MSC hodowane w skafoldach z lizatu płytkowego (LP) w warunkach 5% O₂
- komórki WJ-MSC hodowane w skafoldach z fibrynogenu (FB) w warunkach 21% O₂
- komórki WJ-MSC hodowane w skafoldach z fibrynogenu (FB) w warunkach 5% O₂



Ryc.15. Schemat przeprowadzanych doświadczeń *in vitro*. LP – skafoldy z lizatu płytkowego; FB – skafoldy z fibrynogenu. Wykonano w programie BioRender.

Doświadczenia ex vivo:

- organotypowe skrawki hipokampa szczura (OHC) – kontrola
- OHC uszkodzone poprzez czasowe pozbawienie tlenu i glukozy (OGD)
- OHC po OGD współhodowane z komórkami WJ-MSC hodowanymi w 21% O₂ w warunkach 2D
- OHC po OGD współhodowane z komórkami WJ-MSC hodowanymi w 5% O₂ w warunkach 2D
- OHC po OGD współhodowane z komórkami WJ-MSC hodowanymi w 21% O₂ w skafoldach z lizatu płytkowego
- OHC po OGD współhodowane z komórkami WJ-MSC hodowanymi w 5% O₂ w skafoldach z lizatu płytkowego
- OHC po OGD współhodowane z komórkami WJ-MSC hodowanymi w 21% O₂ w skafoldach z fibryny
- OHC po OGD współhodowane z komórkami WJ-MSC hodowanymi w 5% O₂ w skafoldach z fibryny



Ryc.16. Schemat przeprowadzanych doświadczeń ex vivo. Współhodowlę OHC z komórkami WJ-MSC rozpoczęto bezpośrednio po wykonaniu OGD w 5 dniu hodowli. (OHC – hodowla organotypowa skrawków hipokampa szczura; OGD – czasowe pozbawienie tlenu i glukozy). Wykonano w programie BioRender.

Doświadczenia in vivo:

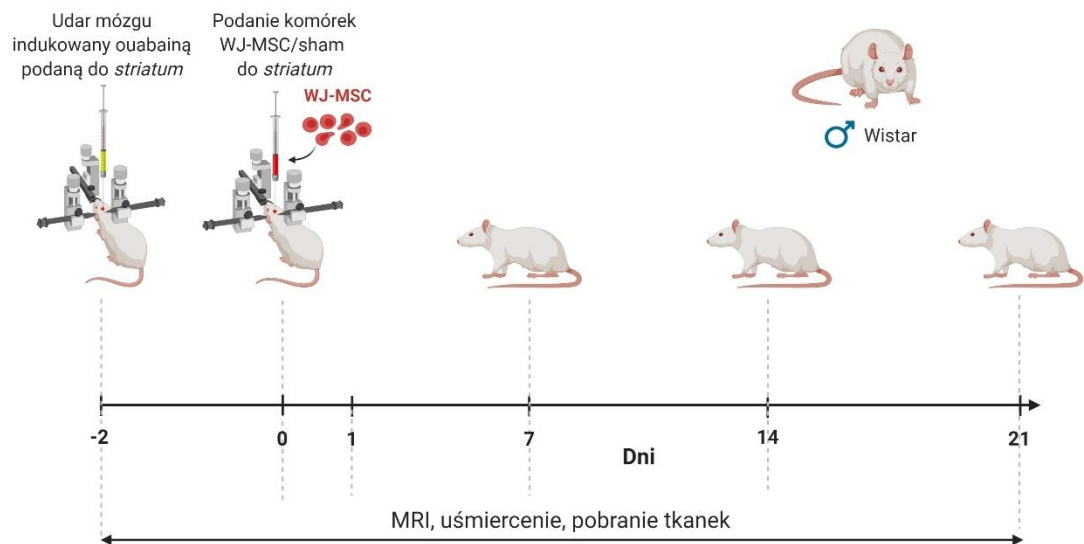
Tabela 6. Wykaz grup eksperymentalnych w doświadczeniach in vivo.

kontrola			
OUA 24h	OUA 7d	OUA 14d	OUA 21d
2D sham 24h	2D sham 7d	2D sham 14d	2D sham 21d
2D 21% O ₂ 24h	2D 21% O ₂ 7d	2D 21% O ₂ 14d	2D 21% O ₂ 21d
2D 5% O ₂ 24h	2D 5% O ₂ 7d	2D 5% O ₂ 14d	2D 5% O ₂ 21d
3D LP sham 24h	3D LP sham 7d	3D LP sham 14d	3D LP sham 21d
3D LP 21% O ₂ 24h	3D LP 21% O ₂ 7d	3D LP 21% O ₂ 14d	3D LP 21% O ₂ 21d
3D LP 5% O ₂ 24h	3D LP 5% O ₂ 7d	3D LP 5% O ₂ 14d	3D LP 5% O ₂ 21d
3D FB sham 24h	3D FB sham 7d	3D FB sham 14d	3D FB sham 21d
3D FB 21% O ₂ 24h	3D FB 21% O ₂ 7d	3D FB 21% O ₂ 14d	3D FB 21% O ₂ 21d
3D FB 5% O ₂ 24h	3D FB 5% O ₂ 7d	3D FB 5% O ₂ 14d	3D FB 5% O ₂ 21d

Opis oznaczeń:

- OUA – szczury po uszkodzeniu mózgu indukowanym ouabainą
- 2D sham – szczury po OUA i podaniu samej soli fizjologicznej
- 2D 21% O₂ – szczury po OUA i transplatacji komórek WJ-MSC w 2D hodowanych w warunkach 21% O₂
- 2D 5% O₂ – szczury po OUA i transplatacji komórek WJ-MSC w 2D hodowanych w warunkach 5% O₂
- 3D LP sham – szczury po OUA i podaniu pustego skafoldu z lizatu płytkowego
- 3D LP 21% O₂ – szczury po OUA i transplatacji komórek WJ-MSC w skafoldach z lizatu płytkowego hodowanych w warunkach 21% O₂
- 3D LP 5% O₂ – szczury po OUA i transplatacji komórek WJ-MSC w skafoldach z lizatu płytkowego hodowanych w warunkach 5% O₂
- 3D FB sham – szczury po OUA i podaniu pustego skafoldu z fibrynogenu
- 3D FB 21% O₂ – szczury po OUA i transplatacji komórek WJ-MSC w skafoldach z fibrynogenu hodowanych w warunkach 21% O₂
- 3D FB 5% O₂ – szczury po OUA i transplatacji komórek WJ-MSC w skafoldach z fibrynogenu hodowanych w warunkach 5% O₂

Po 48 godz. od momentu wywołania uszkodzenia indukowanego ouabainą, zwierzętom podawano komórki WJ-MSC lub sól fizjologiczną/pusty skafold w przypadku grup sham. Materiał do analizy pobierano po 24 godz., 7, 14 i 21 dniach od przeszczepu. W przypadku grup OUA, którym nie podawano komórek/sham, materiał do analizy pobierano w kolejnych 24 godz., 7, 14 i 21 dniach od uszkodzenia mózgu – analogicznie w tych samych dniach, w których pobierano tkanki we wcześniejszych grupach eksperymentalnych z podaniem komórek/sham.



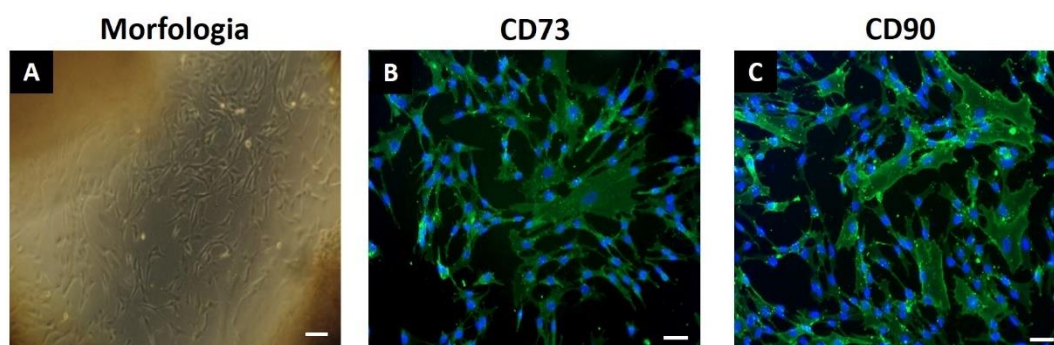
Ryc.17. Schemat przeprowadzanych doświadczeń in vivo. Po uszkodzeniu mózgu indukowanym ouabainą podaną do striatum szczura, przeszczepiano komórki WJ-MSC w miejsce lezji. W różnych punktach czasowych (1, 7, 14, 21 dni) wykonywano obrazowanie mózgu metodą rezonansu magnetycznego oraz pobierano materiał do późniejszej analizy. Wykonano w programie BioRender.

6. Wyniki

6.1. Analiza fenotypu komórek WJ-MSC

Komórki WJ-MSC zostały scharakteryzowane według wytycznych Międzynarodowego Towarzystwa Terapii Komórkowej (ISCT) (Dominici i wsp., 2006), określających minimalne i niezbędne kryteria, jakie muszą spełniać mezenchymalne komórki macierzyste. Kryteria te obejmują: adhezję do powierzchni plastikowego naczynia hodowlanego, wysoką ekspresję markerów powierzchniowych CD73, CD90, CD105, przy jednoczesnym braku ekspresji markerów hematopoetycznych oraz potencjał do różnicowania w inne typy komórek wywodzących się z mezodermalnego listka zarodkowego (adipocyty, osteocyty oraz chondrocyty).

Komórki o podłużnym, wrzecionowatym kształcie, które w pierwszej kolejności migrowały poza fragmenty galarety Whartona i wykazywały adhezję do powierzchni plastiku można było zaobserwować po około pięciu dniach od momentu izolacji w hodowli w warunkach 5% O₂ oraz po około siedmiu dniach w warunkach 21% O₂ (**Ryc.18, A**). Pozyskane komórki WJ-MSC wykazywały również wysoką ekspresję markerów powierzchniowych charakterystycznych dla komórek mezenchymalnych – CD73 oraz CD90 (**Ryc.18, B, C**).

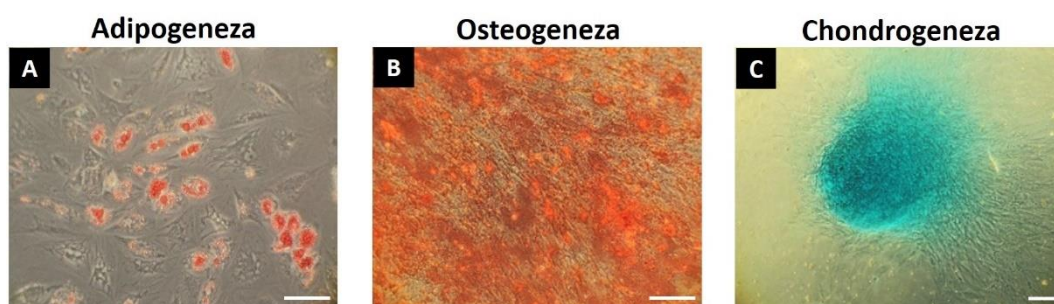


Ryc.18. Fenotyp komórek WJ-MSC migrujących poza fragment tkanki sznura pępowinowego (A). Ekspresja markerów powierzchniowych CD73 oraz CD90 (B, C, zielony). Jądra komórkowe wyznakowano barwnikiem Hoechst (niebieski). Skala: 250 μm (A), 50 μm (B, C).

Po 14 dniach hodowli *in vitro* w pożywce indukującej adipogenezę zaobserwowano w komórkach krople tłuszczu, które następnie zostały wybarwione czerwienią oleistą. Po 21 dniach hodowli komórek w pożywce indukującej osteogenezę, zauważono duże ilości soli wapnia, które uwidoczniło w wyniku

barwienia czerwienią alizarynową. Natomiast po 14 dniach hodowli w pożywce indukującej chondrogenezę, w komórkach WJ-MSC wykryto obecność glikozaminoglikanów, które wybarwiono przy użyciu błękitu alcjanu.

Hodowla komórek WJ-MSC w mediach indukujących różnicowanie mezodermalne wykazała zatem wysoki potencjał WJ-MSC do różnicowania w adipocyty, osteocyty i chondrocyty (**Ryc.19, A-C**). Uzyskane wyniki różnicowania oraz wysoka ekspresja markerów CD73 i CD90 potwierdza mezenchymalny fenotyp pozyskanych komórek WJ-MSC zgodnie z przyjętym standardem ISCT.



Ryc.19. Pozytywny efekt różnicowania komórek WJ-MSC w adipocyty (A) – potwierdzony barwieniem czerwienią oleistą, osteocyty (B) – potwierdzony barwieniem czerwienią alizarynową i chondrocyty (C) – potwierdzony barwieniem błękitem alcjanu. Skala: 250 μ m.

6.2. Charakterystyka skafoldów hydrożelowych i hodowli komórkowych 3D

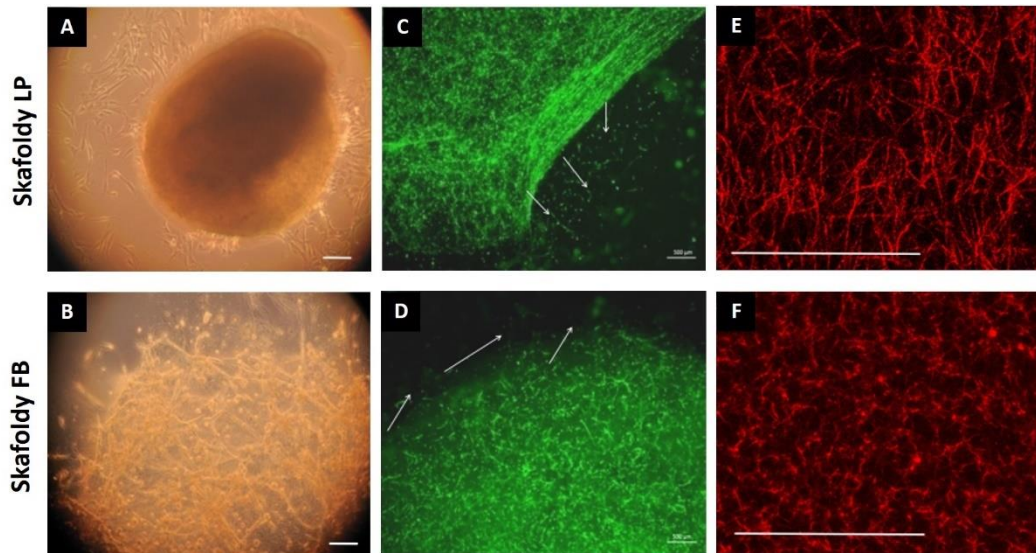
Komórki WJ-MSC hodowano w standardowych warunkach 2D oraz z zastosowaniem trójwymiarowych nośników (skafoldów). Komórki wysiano w dwóch różnych rodzajach hydrożeli: skafoldach wykonanych z lizatu płytkowego (LP) oraz z roztworu fibrynogenu (FB). Hydrożele z komórkami utrzymywano w tych samych warunkach hodowli jak komórki 2D (21% O₂ lub 5% O₂). Po zawieszeniu w rusztowaniach wykonanych z lizatu płytkowego lub fibrynogenu, WJ-MSC zasiedliły całą strukturę skafoldu (**Ryc.20 A, B**), a następnie komórki zaczęły migrować również poza granice rusztowań (komórki znakowane CMFDA – zielona fluorescencja, **Ryc.20 C, D**). W przypadku WJ-MSC hodowanych w skafoldach LP zaobserwowano intensywną migrację komórek poza strukturę rusztowania (**Ryc.20 C**, strzałki), natomiast WJ-MSC hodowane w skafoldach FB pozostawały głównie wewnątrz hydrożelu i wykazywały mniejszą zdolność do migracji poza hydrożel (**Ryc.20 D**, strzałki). Po 7 dniach hodowli *in vitro* liczba

komórek obserwowanych poza strukturą rusztowania FB była mniejsza niż w przypadku WJ-MSC, które migrowały ze skafoldu LP, a następnie ulegały podziałom już w standardowych warunkach 2D.

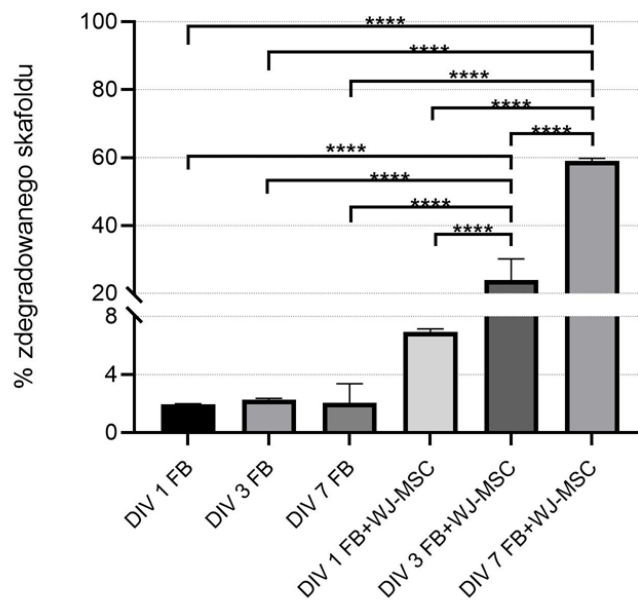
W celu uwidocznienia struktury samego rusztowania frakcją fibrynogenu będącego składnikiem obu skafoldów wyznakowano fibrynogenem sprzężonym z czerwonym fluorochromem. Zaobserwowano wyraźne usieciowanie obu typów rusztowań w postaci włókien fibryny o różnej długości, średnicy i losowym ułożeniu. Takie rusztowanie o określonych warunkach przestrzennych stanowi miejsce przyczepu dla WJ-MSC, a jednocześnie umożliwia ich migrację poza strukturę skafoldu.

Skafold wykonany z fibrynogenu w stężeniu 5 mg/ml usieciowany za pomocą 2 U/ml trombiny miał strukturę gąbczastą o średnicy włókien $\sim 1 \mu\text{m}$ i porach od 3 do 10 μm . Z kolei lizat płytkowy składa się z około 0,43 mg/ml fibrynogenu (Viau i wsp., 2016), dlatego po usieciowaniu trombiną struktura rusztowania stała się włóknista i delikatna, a włókna fibryny były długie i cienkie (średnica $\sim 600 \text{ nm}$). (**Ryc.20 E, F**). Delikatna struktura skafoldu LP była również bardziej podatna na deformację i siły naprężeniowe samych komórek (tzw. „*pulling forces*”), dlatego rusztowania te ulegały obkurczeniu w trakcie trwania hodowli.

Skafoldy fibrynowe nie ulegały degradacji w standardowej pożywce wzrostowej. W kolejnych punktach czasowych zaobserwowano degradację skafoldu FB na poziomie zaledwie $1,95 \pm 0,03\%$ po 24 godz., $2,28 \pm 0,09\%$ po 3 dniach i $2,04 \pm 1,33\%$ po 7 dniach hodowli. W przypadku skafoldów z wysianymi komórkami WJ-MSC, nawet gdy do pożywki wzrostowej dodano aprotyninę (inhibitor proteaz serynowo-treoninowych), rusztowania ulegały wyraźnej degradacji w trakcie hodowli *in vitro*. Po 24 godz. zaobserwowano degradację skafoldów FB na poziomie $6,94 \pm 0,21\%$, po 3 dniach – $23,97 \pm 6,18\%$, zaś po 7 dniach – aż $59 \pm 0,79\%$ (**Ryc.21**).



Ryc.20. Charakterystyka skafoldów hydrożelowych i hodowli komórkowych 3D. WJ-MSC wysiano w hydrożelach wykonanych z lizatu płytkowego (A) lub fibrynowemu (B) i hodowano do 7 dni *in vitro*. Komórki wysiane w skafoldach były zdolne do migracji poza strukturę hydrożelu (zielony, C, D, strzałki). W celu zwizualizowania struktury pustego skafoldu, zastosowano znakowanie sieci fibrynowej przy użyciu fibrynowego sprzężonego z fluorochromem – Alexa Fluor 546 (czerwony, E, F). Skala: 250 μm (A, B), 500 μm (C, D), 50 μm (E, F).



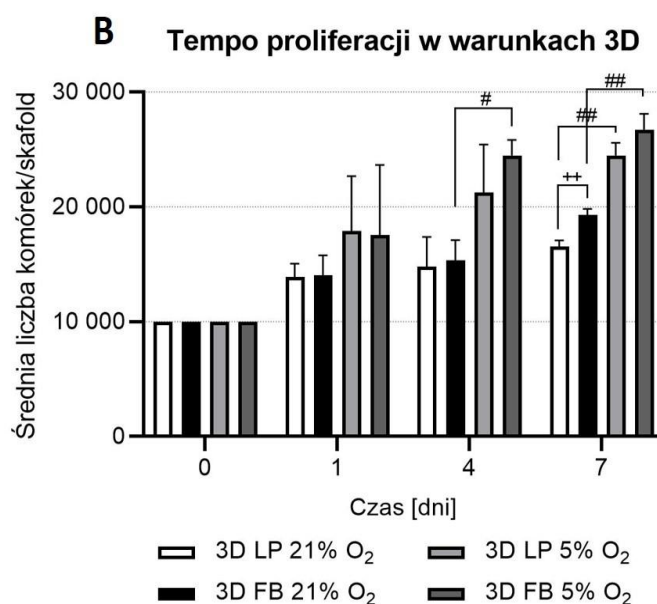
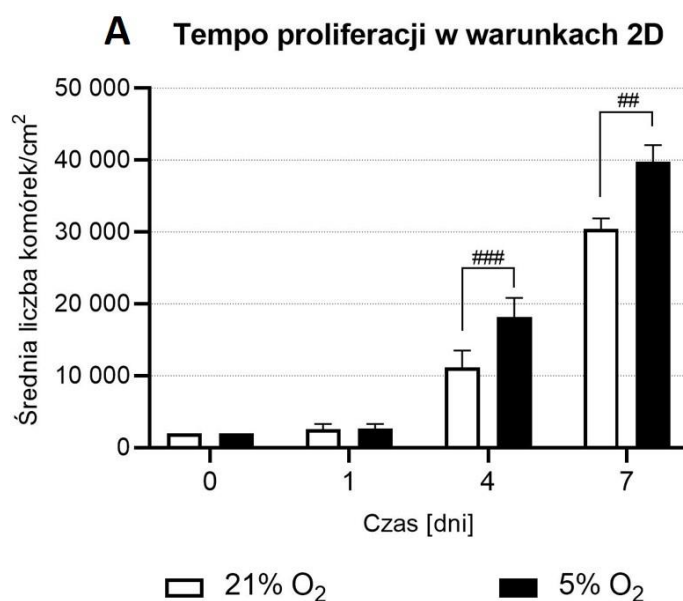
Ryc.21. Analiza tempa degradacji skafoldów FB oraz skafoldów FB z wysianymi komórkami WJ-MSC w różnych punktach czasowych (1, 3, 7 DIV). Obliczenia oparto na pomiarach poziomu fluorescencji uwolnionego znakowanego fibrynowego rusztowania, \pm SD). FB – fibrynowy, DIV – dni hodowli *in vitro*. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednokierunkowej analizy wariancji ANOVA, a następnie testu wielokrotnych porównań Tukey'a; $n=3$, **** $p < 0,0001$.

6.3. Analiza tempa proliferacji komórek WJ-MSC w różnych warunkach hodowli *in vitro*

Analizowano tempo wzrostu komórek WJ-MSC w różnych warunkach przestrzennych i tlenowych. W tym celu określono potencjał proliferacyjny komórek WJ-MSC hodowanych w 2D oraz zasiedlających rusztowania LP oraz FB w trakcie 7-dniowej hodowli prowadzonej w warunkach 21% O₂ oraz 5% O₂ (**Ryc.22**). W hodowli 2D wysiewano komórki w gęstości 2x10³ komórek/cm², natomiast w hodowli 3D początkowa liczba komórek wysiewanych w obu typach rusztowań wynosiła 1x10⁴ komórek/skafold.

Analiza wykazała liniowy wzrost w obu typach hodowli (2D oraz 3D), który był istotnie statystycznie szybszy w warunkach 5% O₂ (fizjologiczna normoksja) niż 21% O₂. WJ-MSC hodowane w warunkach 2D wykazywały podobne tempo proliferacji w obu warunkach tlenowych jedynie w pierwszym dniu analizy (2 544±787 komórek/cm² w 21% O₂ oraz 2 635±696 komórek/cm² w 5% O₂). Wyraźne różnice w tempie proliferacji WJ-MSC hodowanych w warunkach 2D zaobserwowano w 4 dniu analizy. W przypadku hodowli w 21% O₂ liczba komórek wyniosła 11 134±2 388 komórek/cm², natomiast w warunkach fizjologicznej normoksji uzyskano 18 150±2 706 komórek/cm². Po 7 dniach hodowli *in vitro* końcowa liczba komórek hodowanych w 2D w warunkach 21% O₂ wyniosła 30 444±1 457 komórek/cm², natomiast w warunkach 5% O₂ – 39 754±2 371 komórek/cm².

W przypadku hodowli w skafoldach różnice istotne statystycznie zaobserwowano – podobnie jak dla WJ-MSC hodowanych w warunkach 2D – po 4 dniach analizy. Nie odnotowano zmian w proliferacji komórek w zależności od typu skafoldu, zaobserwowano jednak zwiększone tempo podziałów w warunkach fizjologicznej normoksji (15 357±1765 komórek/skafold FB hodowanych w 21% O₂ vs. 24 490±1347 komórek/skafold FB hodowanych w 5% O₂). Siedmiodniowa analiza wykazała, iż typ skafoldu nie miał znaczącego wpływu na szybkość proliferacji WJ-MSC, jednak końcowa liczba komórek w rusztowaniach FB hodowanych w obu stężeniach tlenu była nieco większa niż w przypadku rusztowań LP (26 735±1 388 komórek/skafold FB vs. 24 477±1 112 komórek/skafold LP hodowanych w warunkach 5% O₂ oraz 19 322±506 388 komórek/skafold FB vs. 16 536±563 388 komórek/skafold LP hodowanych w warunkach 21% O₂).

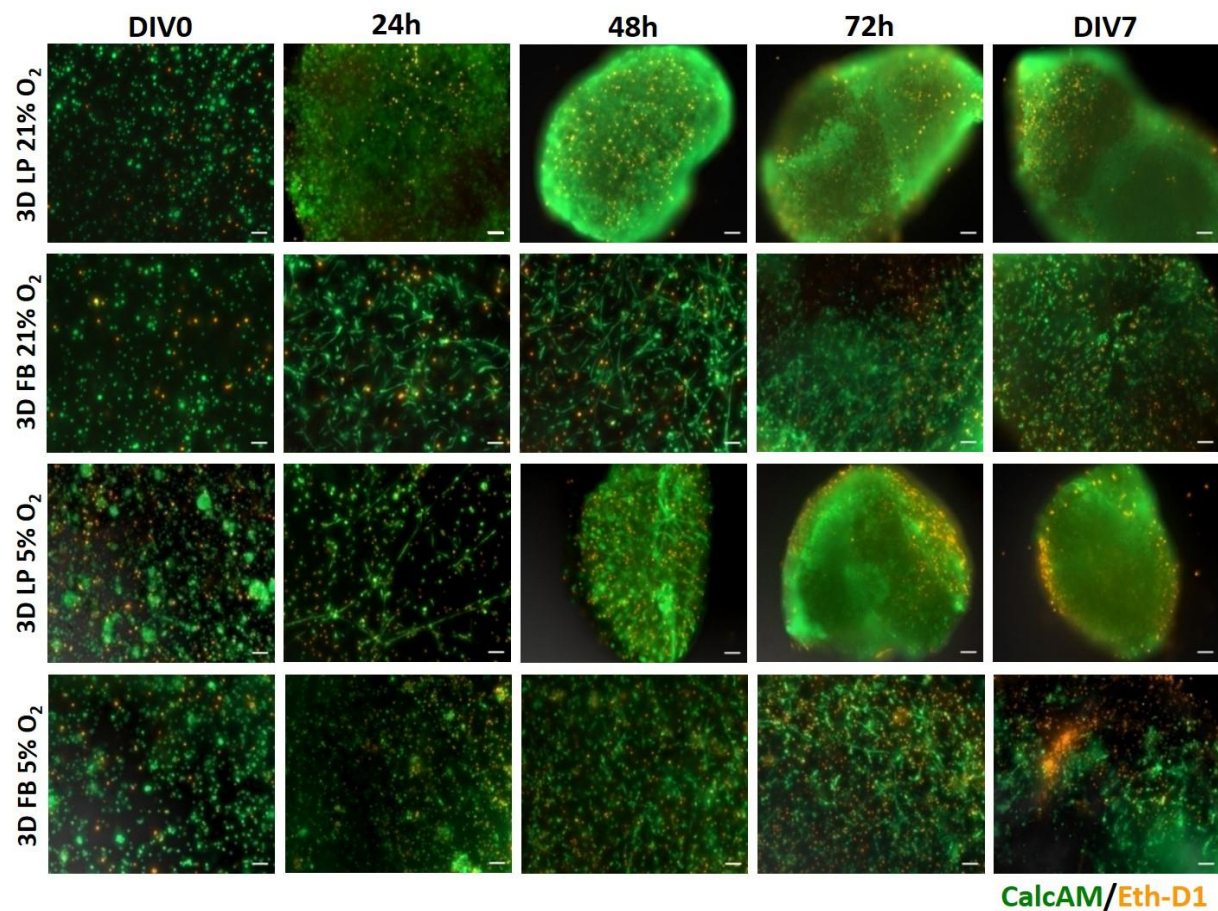


Ryc.22. Analiza tempa proliferacji komórek WJ-MSC hodowanych w różnych warunkach tlenowych w 2D (A) oraz hydrożelowych skafoldach LP/FB (B). Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD. Istotność statystyczną określono za pomocą parametrycznego testu t-Studenta i nieparametrycznego testu Manna Whitney'a w przypadku braku normalności rozkładu (dla tempa proliferacji w 2D) lub jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA), a następnie testu wielokrotnych porównań Tukey'a (dla tempa proliferacji w 3D) ($n = 18$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; ++ $p < 0,01$), gdzie „#” oznacza porównanie warunków hodowli 21% O₂ i 5% O₂, podczas gdy „+” oznacza porównanie pomiędzy komórkami hodowanymi w skafoldach LP i FB.

6.4. Analiza przeżywalności komórek WJ-MSC w skafoldach hydrożelowych

Stosując odpowiednie znaczniki fluorescencyjne – kalceinę i homodimer etydyny – określono dystrybucję żywych i martwych komórek w trakcie siedmiodniowej hodowli WJ-MSC w skafoldach fibrynowych oraz wykonanych z lizatu płytkowego hodowanych w różnych warunkach tlenowych – 21% O₂ oraz 5% O₂ (**Ryc.23**).

Komórki rosnące wewnątrz obu typów rusztowań tworzyły wypustki, które obserwowano już po 24 godz. i 48 godz. hodowli i były widoczne także w ciągu następnych 7 dni analizy. Zaobserwowano również, że struktura rusztowania FB była bardziej trwała w porównaniu do skafoldów LP. Skafoldy wykonane z lizatu płytkowego wyraźnie zmniejszyły swoje wymiary już po 48 godz. hodowli, natomiast w przypadku skafoldów z fibrynogenu struktura hydrożelu nie uległa znaczącej zmianie. Oba typy hydrożeli zapewniły optymalne warunki do przeżycia enkapsulowanych w nich WJ-MSC – komórki wykazywały niską śmiertelność w trakcie 7-dniowej hodowli (**Ryc.23, pomarańczowy**), zarówno w rusztowaniach z fibrynogenu, jak i lizatu płytkowego w obu analizowanych warunkach tlenowych (21% O₂ i 5% O₂).



Ryc.23. Obecność żywych/martwych komórek w skafoldach z lizatu płytkowego (LP) i fibrynogenu (FB) z WJ-MSC hodowanymi w 21% O₂ i 5% O₂. Żywe komórki wyznakowano kalceiną (zielony), natomiast martwe komórki – homodimerem etydyny (pomarańczowy). Obszary uzyskanych obrazów były takie same dla wszystkich badanych skafoldów. Skala = 100 μm. DIV – dni w hodowli in vitro.

6.5. Wpływ warunków przestrzennych i tlenowych na różnicowanie neuralne komórek WJ-MSC

Przeprowadzono ocenę ekspresji markerów związanych z różnicowaniem neuralnym w komórkach WJ-MSC hodowanych w 2D oraz skafoldach LP i FB w różnych warunkach tlenowych. Komórki WJ-MSC wykazują spontaniczną ekspresję markerów nestyny, β -Tubuliny III, neurofilamentu 200 (NF-200) i kwaśnego włókienkowego białka glejowego (GFAP) podczas hodowli w standardowej pożywce wzrostowej (bez zastosowania czynników różnicujących) na poziomie mRNA oraz białka. Analiza immunocytochemiczna oraz ekspresji na poziomie mRNA dowiodła, że WJ-MSC hodowane w rusztowaniach LP i FB wykazywały istotną statystycznie zwiększoną ekspresję nestyny, β -Tubuliny III, NF-200 i GFAP w obu stężeniach tlenu (21% i 5%) w porównaniu do standardowej hodowli 2D. Efekt ten zaobserwowano już po 24 godz. i utrzymywał się również w trakcie kolejnych dni hodowli *in vitro* (Ryc.24, 25).

Zaobserwowano wzrost ekspresji nestyny na poziomie mRNA 24 godz. po zawieszeniu komórek WJ-MSC zarówno w skafoldach LP, jak i FB w obu analizowanych warunkach tlenowych w porównaniu do hodowli 2D. W przypadku warunków fizjologicznej normoksji odnotowano wyższą ekspresję nestyny niż w warunkach tlenu atmosferycznego. Po 5 dniach hodowli *in vitro* utrzymywał się zwiększony poziom ekspresji nestyny w skafoldach w porównaniu do 2D, głównie w warunkach 5% O₂. W komórkach hodowanych w hydrożelach fibrynowych obserwowano ponadto wzrost ekspresji nestyny w porównaniu do poziomu obserwowanego w komórkach hodowanych w skafoldach LP.

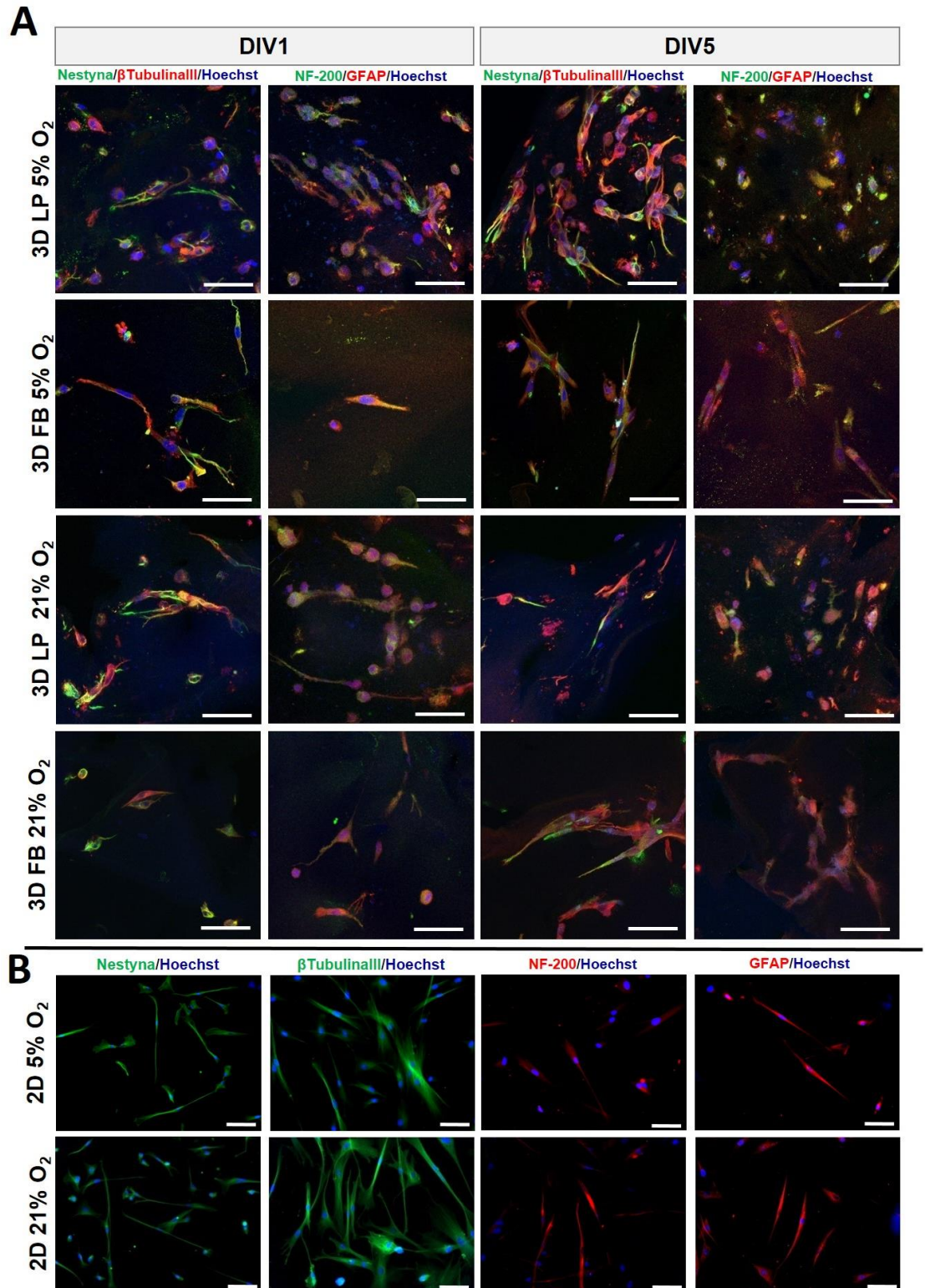
Poziom ekspresji β -Tubuliny III uległ zwiększeniu po 24 godz. od wysiania komórek WJ-MSC w skafoldach w obu analizowanych warunkach tlenowych w porównaniu do hodowli 2D, głównie w skafoldach LP. W przypadku warunków atmosferycznego stężenia tlenu odnotowano wyższą ekspresję β -Tubuliny III niż w warunkach 5% O₂. Po 5 dniach hodowli *in vitro* utrzymywał się zwiększony poziom ekspresji β -Tubuliny III w skafoldach w porównaniu do 2D, głównie w warunkach 21% O₂.

Zaobserwowano także wzrost ekspresji markera *NF-200* po zawieszeniu komórek WJ-MSC zarówno w hydrożelach LP, jak i FB w obu analizowanych warunkach tlenowych w porównaniu do hodowli 2D. W przypadku warunków fizjologicznej normoksji odnotowano wyższą ekspresję *NF-200* niż w warunkach

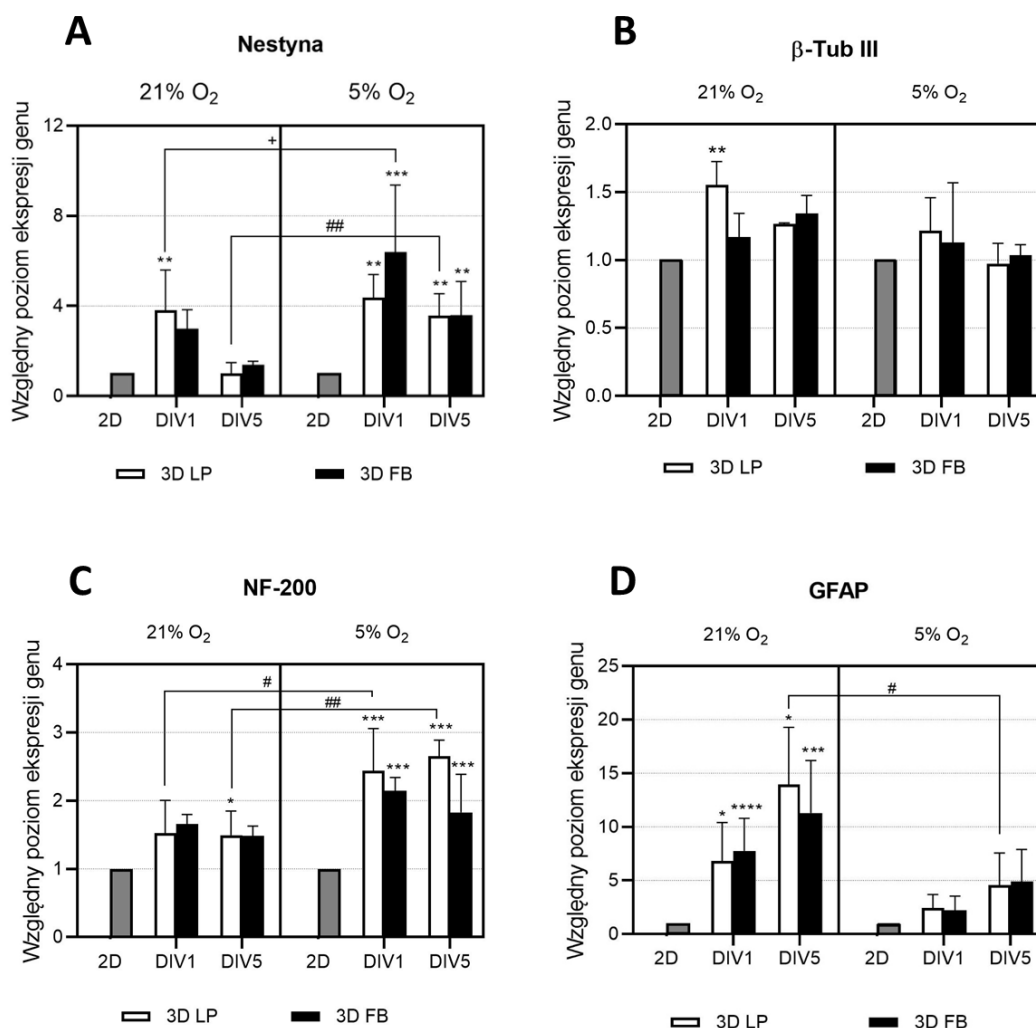
tlenu atmosferycznego. Po 5 dniach hodowli *in vitro* utrzymywał się zwiększony poziom ekspresji *NF-200* w skafoldach w porównaniu do 2D, głównie w warunkach 5% O₂. Poziom ekspresji *NF-200* w warunkach 21% O₂ utrzymywał się na podobnym poziomie w obu typach skafoldów, natomiast w warunkach 5% O₂ zaobserwowano wyższą ekspresję w skafoldach wykonanych na bazie lizatu płytkowego.

Poziom ekspresji *GFAP* również uległ zwiększeniu po 24 godz. od wysiania komórek WJ-MSC w skafoldach w obu analizowanych warunkach tlenowych w porównaniu do hodowli 2D. W przypadku warunków atmosferycznego stężenia tlenu odnotowano wyższą ekspresję *GFAP* niż w warunkach 5% O₂. Po 5 dniach hodowli *in vitro* utrzymywał się zwiększony poziom ekspresji *GFAP* w komórkach hodowanych w skafoldach w porównaniu do 2D, głównie w warunkach 21% O₂ i skafoldach LP.

Zaobserwowano, że możliwa jest zmiana kierunku różnicowania WJ-MSC w zależności od zastosowanego w hodowli stężenia tlenu. Przy 21% O₂ stwierdzono wzrost różnicowania w kierunku glejowym (zwiększona statystycznie ekspresja mRNA dla *GFAP*, **Ryc.25**). Natomiast fizjologiczna normoksja (5% O₂) sprzyjała zwiększonej ekspresji markera neuralnych komórek macierzystych – nestyny oraz *NF-200* – markera bardziej zróżnicowanych neuronów.



Ryc.24. Analiza ekspresji markerów neuralnych w komórkach WJ-MSC w skafoldach z lizatu płytkowego/fibrynogenu (A) lub hodowanych w standardowych warunkach 2D (B) po 1 i 5 dniach hodowli w 21% O₂ lub 5% O₂. Reprezentatywne zdjęcia analizy immunocytochemicznej markerów neuralnych, neuronalnych i astrocytów (odpowiednio nestyny, β -Tubuliny III, NF-200, GFAP). Skala = 100 μ m. DIV – dni w hodowli in vitro.



Ryc.25. Analiza ekspresji markerów nestyny, β -Tubuliny III, NF-200 i GFAP na poziomie mRNA w WJ-MSC hodowanych w warunkach 2D i 3D po 1 i 5 dniach hodowli. Względny poziom ekspresji analizowanych genów znormalizowano względem poziomu ekspresji genu referencyjnego ACTB. Wyniki przedstawiono w odniesieniu do warunków kontrolnych 2D (wartość = 1, istotność statystyczna oznaczona „*”). Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, a następnie testu wielokrotnych porównań Tukey’a ($n = 9$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; + $p < 0,05$), gdzie „#” oznacza porównanie warunków hodowli 21% O₂ i 5% O₂, podczas gdy „+” oznacza istotność statystyczną poziomu ekspresji mRNA pomiędzy komórkami hodowanymi w skafoldach LP i FB. DIV – dni w hodowli in vitro.

6.6. Wpływ warunków mikrośrodowiska na profil ekspresji komórek WJ-MSC

6.6.1. Analiza poziomu ekspresji cytokin i neurotrofin w komórkach WJ-MSC w zależności od warunków hodowli *in vitro*

W komórkach WJ-MSC hodowanych w 2D i 3D w różnych warunkach stężenia tlenu (21% O₂ i 5% O₂) określono zmiany w profilu ekspresji wybranych cytokin istotnych dla przeżycia, wzrostu i różnicowania komórek nerwowych oraz związanych z odpowiedzią zapalną. Analizę przeprowadzono 24 godz. po wysianiu komórek w skafoldach LP i FB oraz w dłuższej hodowli *in vitro* (5 dni) w porównaniu do standardowej hodowli 2D.

Zaobserwowano wzrost ekspresji *BDNF* na poziomie mRNA 24 godz. po wysianiu komórek WJ-MSC zarówno w skafoldach LP, jak i FB w obu analizowanych warunkach tlenowych w porównaniu do hodowli dwuwymiarowej. W przypadku warunków atmosferycznego stężenia tlenu odnotowano wyższą ekspresję *BDNF* niż w warunkach 5% O₂. Po 5 dniach hodowli *in vitro* utrzymywał się zwiększony poziom ekspresji *BDNF* w warunkach 3D w porównaniu do 2D, głównie w 21% O₂. W komórkach hodowanych w skafoldach FB obserwowano ponadto wzrost ekspresji *BDNF* w porównaniu do komórek hodowanych w skafoldach LP.

Dwadzieścia cztery godziny od enkapsulacji badanych komórek w hydrożelach poziom ekspresji czynnika *GDNF* wykazywał tendencję wzrostową (brak istotności statystycznej) w obu badanych warunkach tlenowych, w porównaniu do hodowli 2D, głównie w hydrożelach fibrynowych. W przypadku warunków fizjologicznej normoksji odnotowano wyższą ekspresję *GDNF* niż w warunkach tlenu atmosferycznego. Po 5 dniach hodowli *in vitro* utrzymywał się zwiększony poziom ekspresji *GDNF* w skafoldach w porównaniu do 2D, głównie w warunkach 5% O₂ i skafoldach LP.

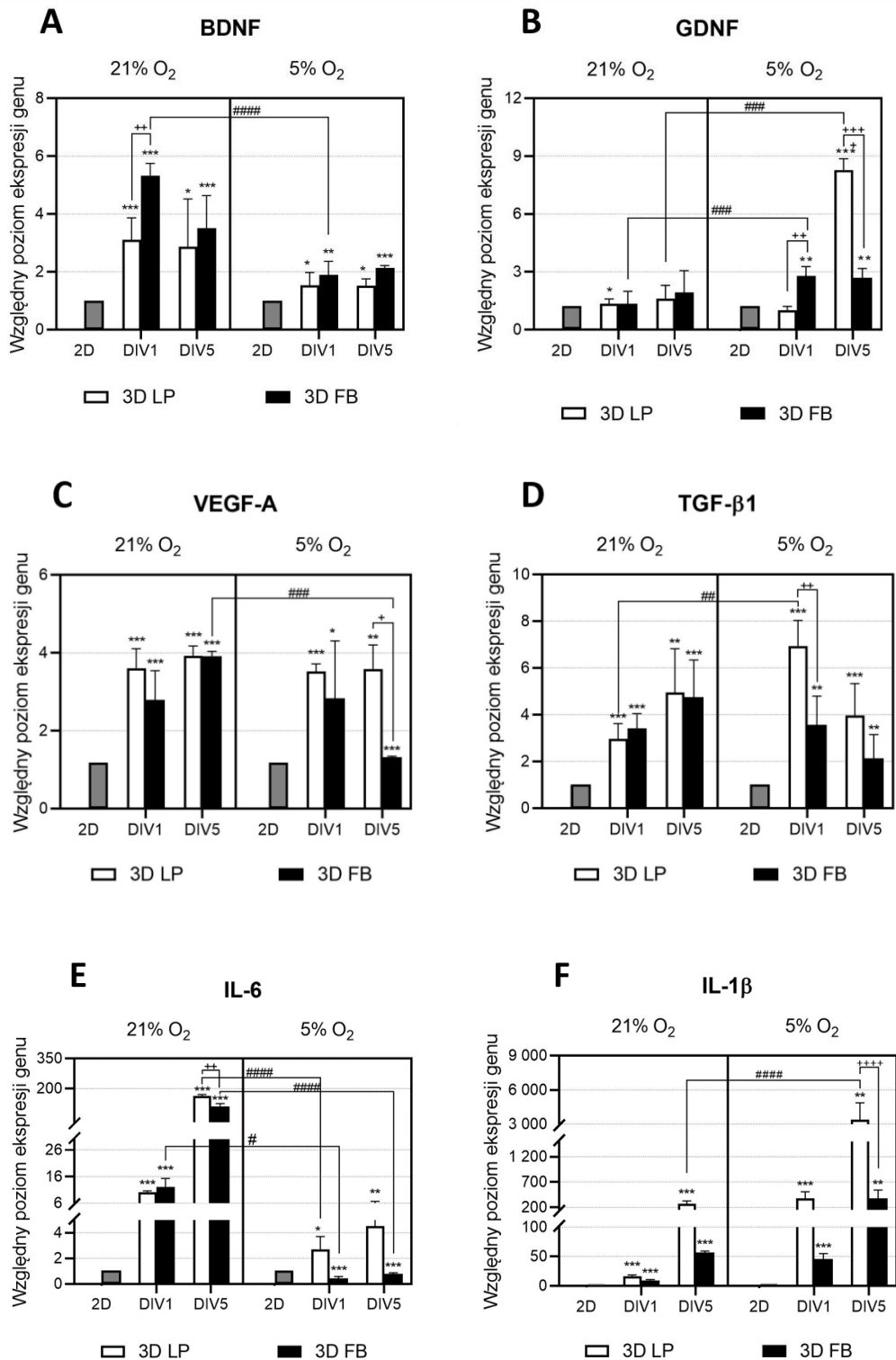
Tak jak w przypadku innych analizowanych markerów, pod wpływem zmian warunków przestrzennych z dwu- na trójwymiarowe wzrostowi uległa również ekspresja *VEGF-A* w obu analizowanych warunkach tlenowych. Po 5 dniach hodowli *in vitro* w 3D, głównie w warunkach 21% O₂, utrzymywał się zwiększony poziom ekspresji *VEGF-A* w porównaniu do hodowli standardowej (2D). Poziom ekspresji *VEGF-A* w warunkach 21% O₂ utrzymywał się na

podobnym poziomie w obu typach szkieletów, natomiast w warunkach 5% O₂ zaobserwowano wyższą ekspresję w szkieletach LP.

Poziom ekspresji *TGF-β1* uległ zwiększeniu po 24 godz. od wysiania komórek WJ-MSC w szkieletach w obu analizowanych warunkach tlenowych w porównaniu do hodowli 2D, głównie w szkieletach LP w 5% O₂. Po 5 dniach hodowli *in vitro* ekspresja *TGF-β1* utrzymywała się na zwiększonym poziomie w szkieletach w porównaniu do standardowej hodowli 2D. Ponadto, w warunkach 21% O₂ ekspresję *TGF-β1* obserwowano na podobnym poziomie, natomiast w warunkach 5% O₂ odnotowano zwiększoną ekspresję w szkieletach LP.

Zaobserwowano wzrost ekspresji *IL-6* na poziomie mRNA 24 godz. po wysianiu komórek WJ-MSC zarówno w szkieletach LP, jak i FB w obu analizowanych warunkach tlenowych w porównaniu do hodowli 2D. W przypadku warunków atmosferycznego stężenia tlenu odnotowano wyższą ekspresję *IL-6* niż w warunkach 5% O₂. Po 5 dniach hodowli *in vitro* utrzymywał się zwiększony poziom ekspresji *IL-6* w szkieletach w porównaniu do 2D, głównie w warunkach 21% O₂. W komórkach hodowanych w szkieletach LP obserwowano ponadto wzrost ekspresji *IL-6* w porównaniu do komórek hodowanych w szkieletach FB.

Poziom ekspresji *IL-1β* uległ zwiększeniu po 24 godz. od wysiania komórek WJ-MSC w szkieletach w obu analizowanych warunkach tlenowych w porównaniu do hodowli 2D, głównie w szkieletach LP. W przypadku warunków fizjologicznej normoksji odnotowano statystycznie wyższą ekspresję *IL-1β* niż w warunkach tlenu atmosferycznego. Po 5 dniach hodowli *in vitro* utrzymywał się zwiększony poziom ekspresji *IL-1β* w szkieletach w porównaniu do 2D, głównie w warunkach 5% O₂ i szkieletach LP.



Ryc.26. Analiza ekspresji czynników troficznych i cytokin BDNF, GDNF, VEGF-A, TGF-β1, IL-6, IL-1β na poziomie mRNA w komórkach WJ-MSC hodowanych w warunkach 2D lub 3D w 21% O₂ lub 5% O₂. Względny poziom ekspresji analizowanych genów znormalizowano względem poziomu ekspresji genu referencyjnego ACTB. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SD w odniesieniu do warunków kontrolnych 2D (wartość = 1, istotność statystyczna oznaczona „*”). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, a następnie testu wielokrotnych porównań Tukey’a (n = 9; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ##p < 0,01; ####p < 0,001;

$p < 0,0001$; ++ $p < 0,01$; ++++ $p < 0,0001$), gdzie „#” oznacza porównanie warunków hodowli 21% O_2 i 5% O_2 , podczas gdy „+” oznacza istotność statystyczną poziomu ekspresji mRNA pomiędzy komórkami hodowanymi w skafoldach LP i FB. DIV – dni w hodowli *in vitro*.

6.6.2. Ocena odpowiedzi komórek WJ-MSC na stymulację czynnikami prozapalnymi

W celu odwzorowania warunków występujących w uszkodzonej tkance, gdzie przeszczepiane komórki ulegają ekspozycji na silne działanie mikrośrodowiska zapalnego, WJ-MSC stymulowano *in vitro* poprzez dodanie czynników prozapalnych (TNF α 5 ng/ml + IFN γ 5 ng/ml). Hodowle prowadzono tylko w warunkach „fizjologicznej normoksji” 5% O_2 . Komórki hodowano w pożywce pozbawionej surowicy, aby wyeliminować wpływ czynników zawartych w lizacie płytkowym, który jest składnikiem pożywki wzrostowej dla WJ-MSC. Następnie oceniano odpowiedź komórek na działanie czynników stymulujących na podstawie profilu ekspresji wybranych neurotrofin i cytokin pro- i przeciwzapalnych w poszczególnych wariantach eksperymentalnych (**Ryc.27, 28**):

- kontrola – komórki hodowane w warunkach 2D bez/lub z dodatkiem TNF α i IFN γ ;
- prekondycjonowanie nr 1 – komórki hodowane w warunkach 2D, a następnie 3D bez TNF α i IFN γ ;
- prekondycjonowanie nr 2 – komórki hodowane przez 24 godz. w warunkach 2D bez TNF α i IFN γ , a następnie zawieszono w skafoldach i hodowane przez 24 godz. z dodatkiem TNF α i IFN γ ;
- prekondycjonowanie nr 3 – komórki hodowane przez 24 godz. w warunkach 2D z dodatkiem TNF α i IFN γ , a następnie zawieszono w skafoldach i hodowane przez 24 godz. również z dodatkiem TNF α i IFN γ .

Zaobserwowano wyraźny wzrost ekspresji *IDO-1* w komórkach WJ-MSC hodowanych w standardowych warunkach 2D po zastosowaniu czynników stymulujących. Zastosowanie czynników prozapalnych na etapie hodowli trójwymiarowej spowodowało znaczący wzrost ekspresji *IDO-1* w WJ-MSC (prekondycjonowanie nr 2). Dodatkowa prestymulacja komórek przed ich zawieszeniem w skafoldach skutkowałą znaczącym wzrostem poziomu ekspresji *IDO-1* (prekondycjonowanie nr 3). Zmiana warunków przestrzennych hodowli

wywołała nieznaczny wzrost ekspresji tego czynnika w komórkach zawieszonych zarówno w hydrożelach lizatowych, jak i fibrynowych (prekondycjonowanie nr 1).

Poziom ekspresji *TSG-6* uległ zwiększeniu w komórkach WJ-MSC hodowanych w standardowych warunkach 2D po zastosowaniu czynników stymulujących. Wyższy poziom ekspresji *TSG-6* zaobserwowano również po enkapsulacji komórek w hydrożelach (prekondycjonowanie nr 1) w porównaniu do kontroli 2D. Zastosowanie czynników stymulujących na etapie hodowli 3D spowodowało znaczący wzrost ekspresji *TSG-6* w WJ-MSC (prekondycjonowanie nr 2). Dodatkowa prestymulacja komórek przed ich wysianiem w skafoldach skutkowała zwiększeniem poziomu ekspresji *TSG-6* (prekondycjonowanie nr 3), szczególnie w skafoldach FB.

Zastosowanie czynników stymulujących nie wpłynęło na zmianę ekspresji *BDNF* w komórkach WJ-MSC hodowanych w standardowych warunkach 2D. Po wysianiu komórek w skafoldach zaobserwowano wzrost ekspresji *BDNF* w obu typach hydrożeli (prekondycjonowanie nr 1) w porównaniu do kontroli 2D. Zastosowanie czynników stymulujących na etapie hodowli 3D spowodowało wzrost ekspresji *BDNF* w WJ-MSC (prekondycjonowanie nr 2), szczególnie w skafoldach FB. Prestymulacja komórek WJ-MSC czynnikami prozapalnymi przed ich enkapsulacją spowodowała zwiększenie poziomu ekspresji *BDNF* (prekondycjonowanie nr 3), zwłaszcza w skafoldach FB.

W przypadku *GDNF* zaobserwowano nieznaczny wzrost ekspresji po wysianiu komórek w hydrożelach LP i FB (prekondycjonowanie nr 1) oraz po zastosowaniu $TNF\alpha$ i $IFN\gamma$ w komórkach WJ-MSC hodowanych w standardowych warunkach 2D. Dodanie czynników prozapalnych na etapie hodowli w warunkach 3D spowodowało wzrost ekspresji *GDNF* (prekondycjonowanie nr 2), głównie w skafoldach LP. Prestymulacja komórek WJ-MSC skutkowała dodatkowym wzrostem ekspresji *GDNF* (prekondycjonowanie nr 3), zwłaszcza w skafoldach FB.

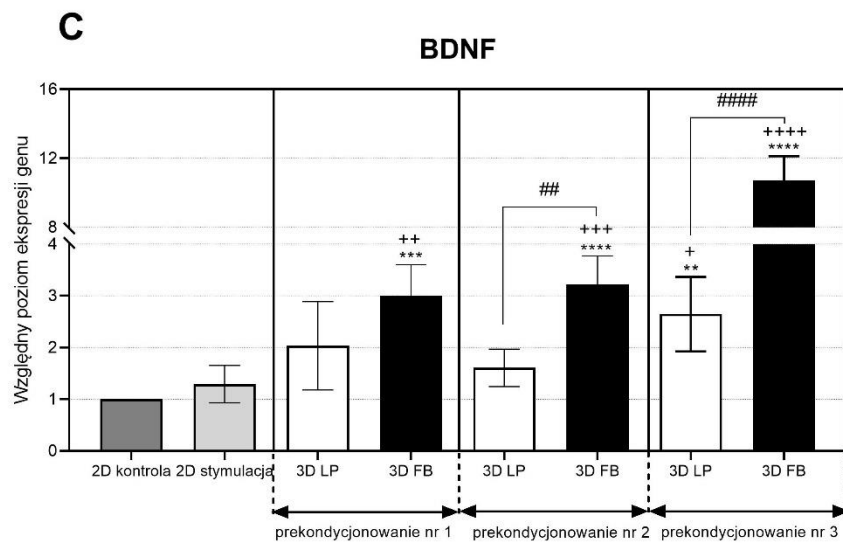
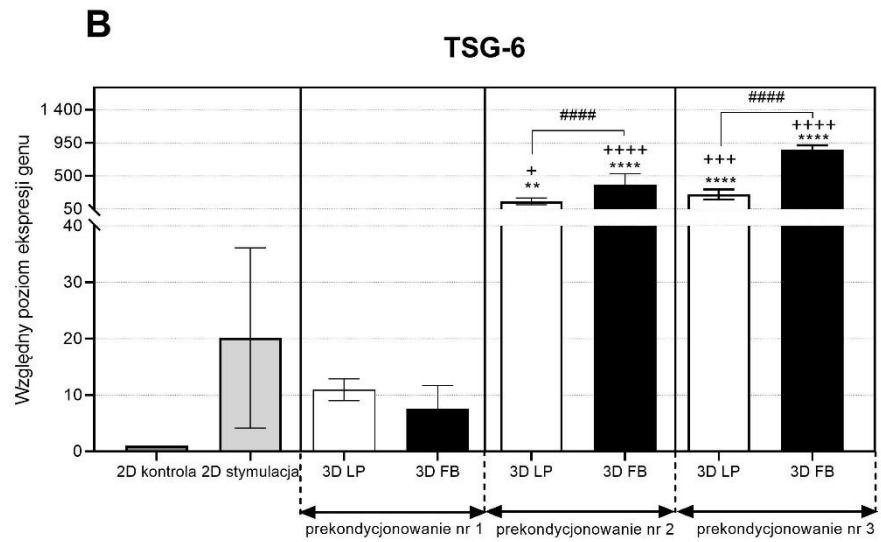
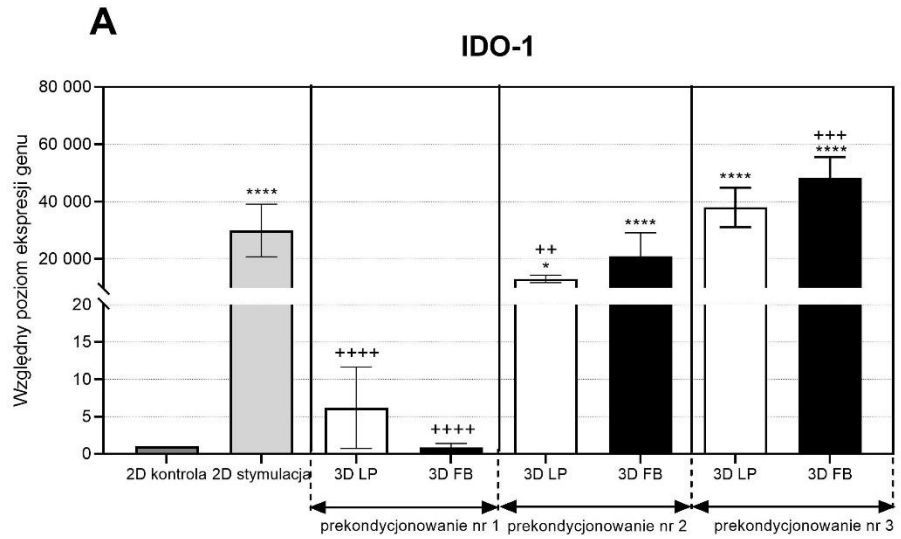
Poziom ekspresji *VEGF-A* po zastosowaniu czynników prozapalnych na etapie hodowli w warunkach 3D (prekondycjonowanie nr 2) oraz w wyniku prestymulacji WJ-MSC przed ich wysianiem w hydrożelach (prekondycjonowanie nr 3) utrzymywał się na podobnym poziomie. Wyższą ekspresję zaobserwowano w komórkach WJ-MSC hodowanych w skafoldach LP. Najwyższy poziom ekspresji *VEGF-A* odnotowano z kolei w komórkach hodowanych w warunkach

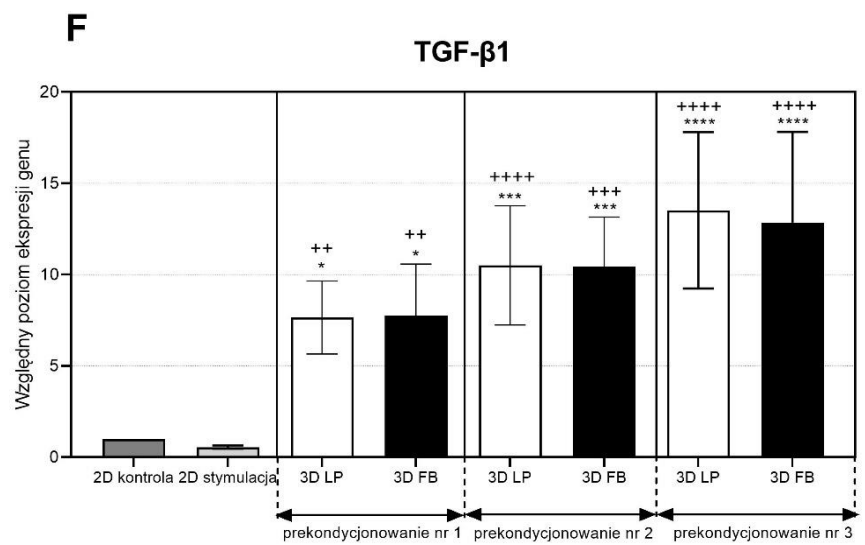
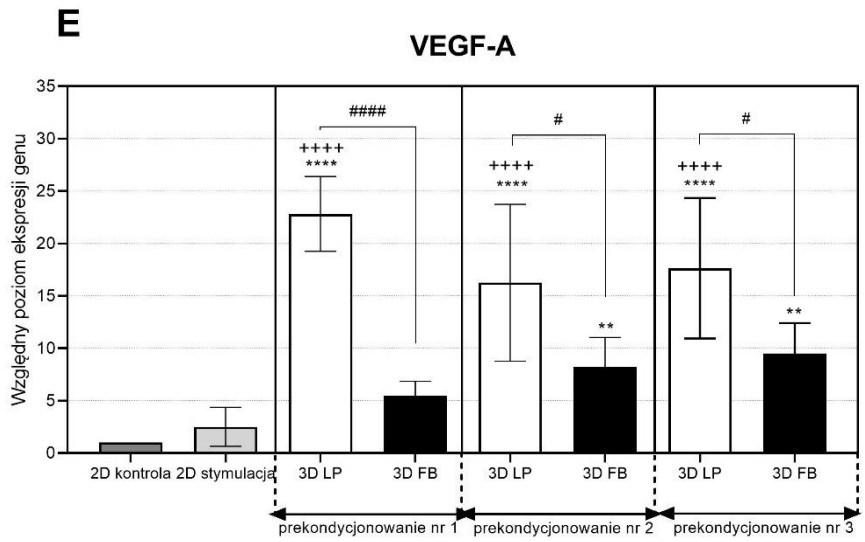
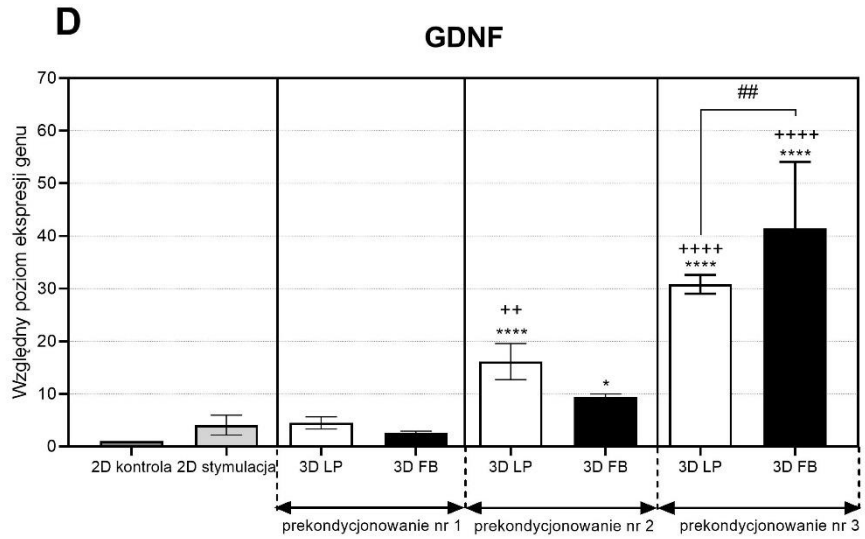
3D bez czynników stymulujących (prekondycjonowanie nr 1), szczególnie w skafoldach LP.

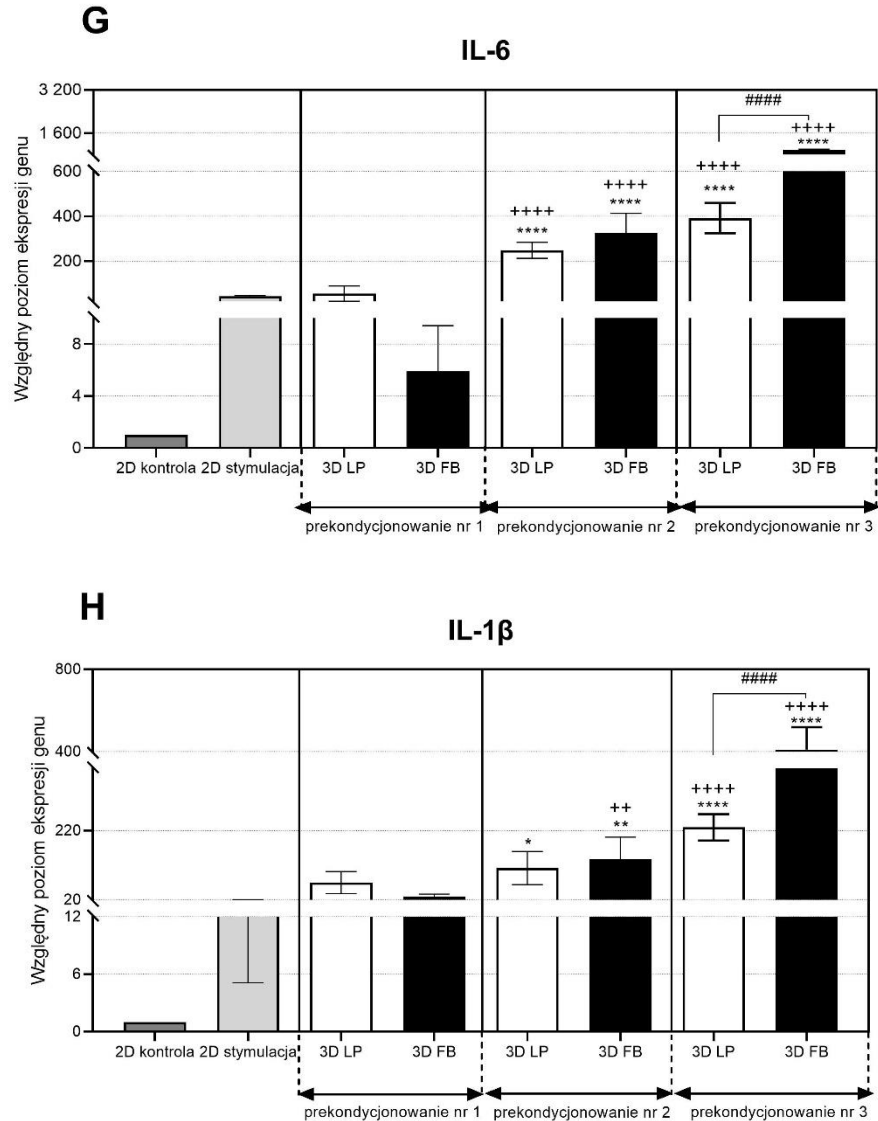
Poziom ekspresji *TGF- β 1* uległ zwiększeniu w następstwie enkapsulacji WJ-MSC w skafoldach LP oraz FB (prekondycjonowanie nr 1). W wyniku stymulacji komórek WJ-MSC czynnikami prozapalnymi na etapie hodowli w warunkach 3D (prekondycjonowanie nr 2) zaobserwowano wzrost ekspresji *TGF- β 1* w obu rodzajach hydrożeli. Najwyższy poziom ekspresji *TGF- β 1* odnotowano po wstępnej stymulacji komórek WJ-MSC w hodowli 2D i dodatkowym zastosowaniu czynników stymulujących po wysianiu komórek w skafoldach (prekondycjonowanie nr 3). W przypadku komórek hodowanych w standardowych warunkach 2D, dodanie TNF α i IFN γ nie wpłynęło na poziom ekspresji *TGF- β 1*.

W przypadku enkapsulacji komórek WJ-MSC w hydrożelach zaobserwowano wzrost ekspresji *IL-6* (prekondycjonowanie nr 1) w porównaniu do kontroli 2D, głównie w skafoldach LP. Po zastosowaniu czynników prozapalnych zaobserwowano zwiększony poziom ekspresji *IL-6* w komórkach hodowanych w standardowych warunkach 2D niż w kontroli. Dodanie TNF α i IFN γ na etapie hodowli 3D spowodowało znaczący wzrost ekspresji *IL-6* w WJ-MSC (prekondycjonowanie nr 2). Najwyższy poziom ekspresji *IL-6* odnotowano po stymulacji komórek czynnikami prozapalnymi na etapie hodowli 2D i dodatkowej stymulacji po enkapsulacji komórek w hydrożelach (prekondycjonowanie nr 3), szczególnie w skafoldach FB.

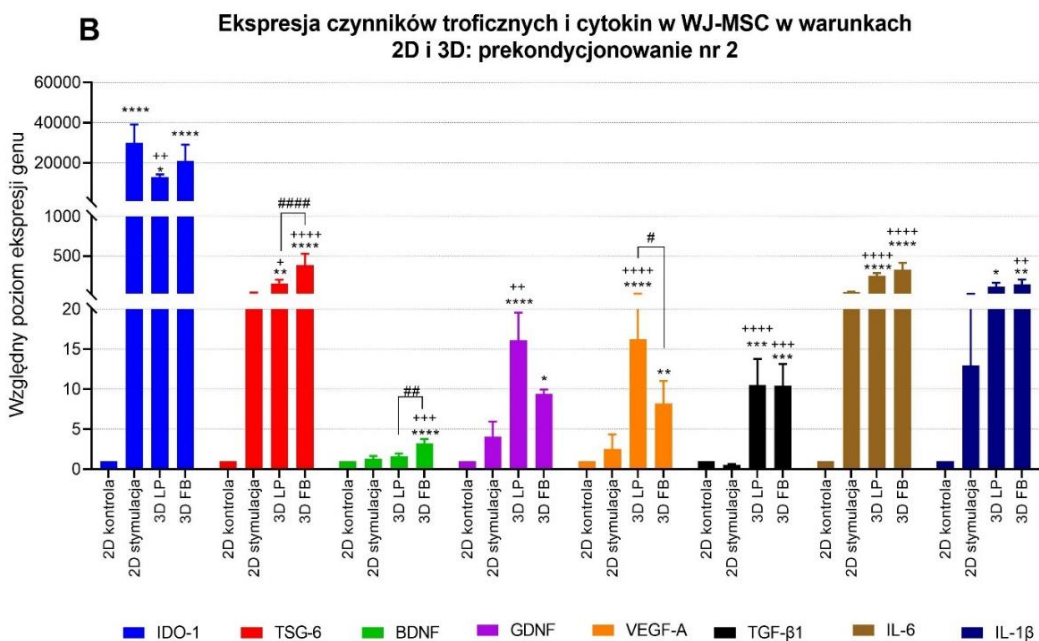
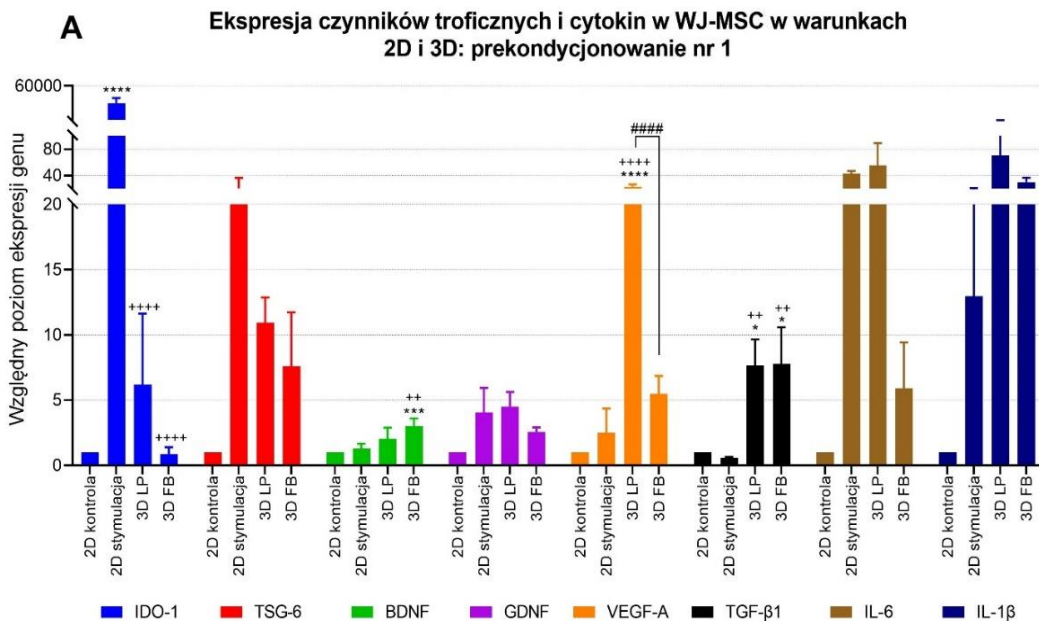
Ekspresję *IL-1 β* zaobserwowano na znacznie wyższym poziomie po wysianiu WJ-MSC w skafoldach (prekondycjonowanie nr 1) w porównaniu do warunków kontrolnych 2D. Podobny poziom ekspresji odnotowano w komórkach w hodowli 2D po zastosowaniu czynników prozapalnych. W następstwie stymulacji komórek WJ-MSC poprzez dodanie TNF α i IFN γ na etapie hodowli w warunkach 3D zaobserwowano znaczący wzrost ekspresji *IL-1 β* (prekondycjonowanie nr 2). Prestymulacja komórek WJ-MSC już na etapie hodowli 2D, a następnie 3D skutkowała dodatkowym wzrostem ekspresji *IL-1 β* (prekondycjonowanie nr 3), zwłaszcza w skafoldach FB.

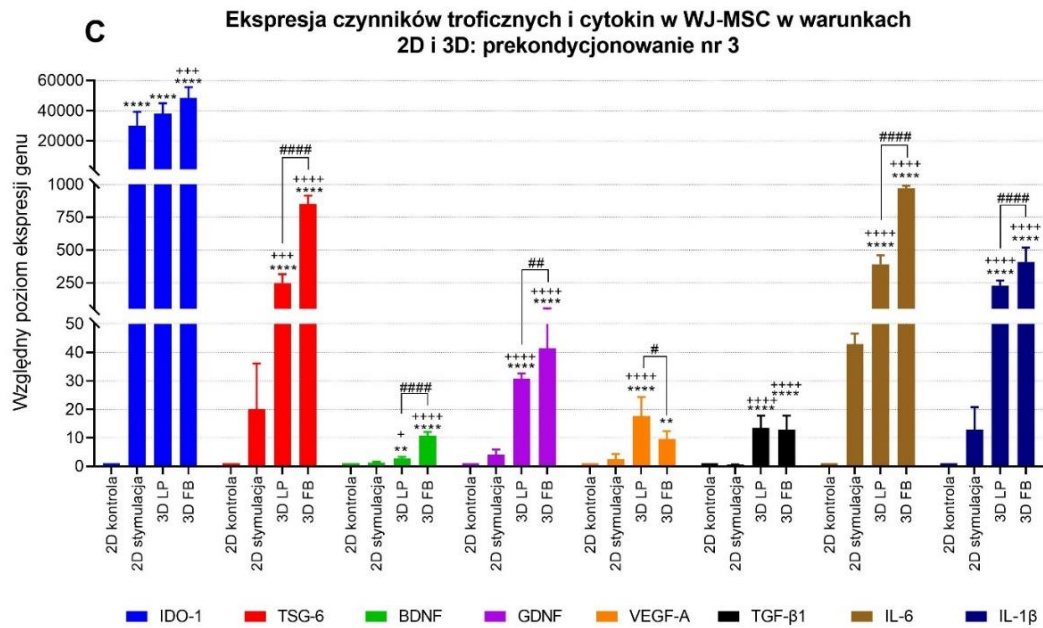






Ryc.27. Analiza ekspresji poszczególnych czynników troficznych i cytokin *IDO-1*, *TSG-6*, *BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*, *TGF- β 1*, *IL-6*, *IL-1 β* na poziomie mRNA w komórkach WJ-MSC hodowanych w warunkach 2D lub 3D po stymulacji czynnikami prozapalnymi – *TNF α* (5 ng/ml) i *IFN γ* (5 ng/ml) lub w warunkach kontrolnych (bez dodatku *TNF α* i *IFN γ*). Względny poziom ekspresji analizowanych genów znormalizowano względem poziomu ekspresji genu referencyjnego *ACTB*. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD w odniesieniu do warunków kontrolnych 2D (wartość = 1, istotność statystyczna oznaczona „*”). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, a następnie testu wielokrotnych porównań Tukey’a ($n = 9$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$; ++++ $p < 0,0001$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$), gdzie „+” oznacza porównanie poziomu ekspresji mRNA w komórkach hodowanych w skafoldach w odniesieniu do hodowli 2D po zastosowaniu czynników stymulujących, zaś „#” oznacza istotność statystyczną poziomu ekspresji mRNA pomiędzy komórkami hodowanymi w skafoldach LP i FB w danym wariancie eksperymentalnym.





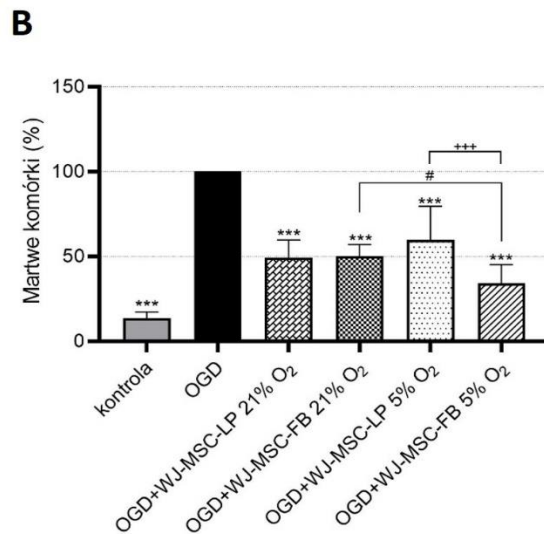
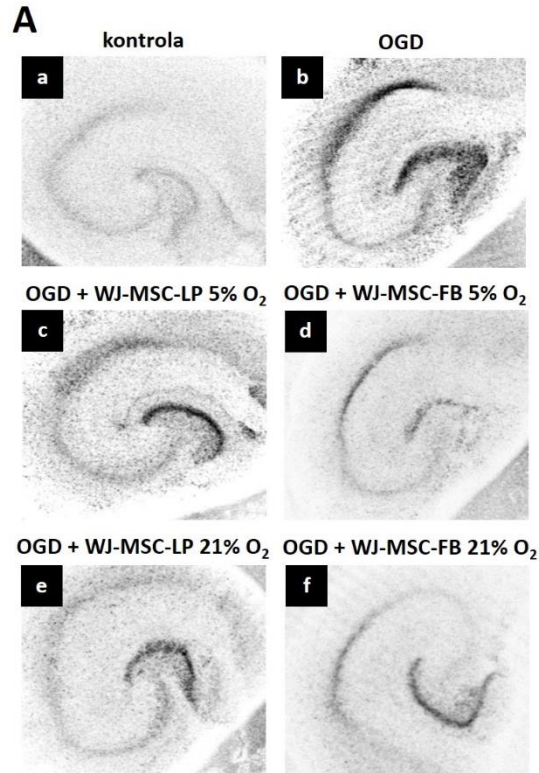
Ryc.28. Analiza ekspresji czynników troficznych i cytokin *IDO-1*, *TSG-6*, *BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*, *TGF-β1*, *IL-6*, *IL-1β* na poziomie mRNA w komórkach WJ-MSC hodowanych w danych warunkach prekondycjonowania. Względny poziom ekspresji analizowanych genów znormalizowano względem poziomu ekspresji genu referencyjnego *ACTB*. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD w odniesieniu do warunków kontrolnych 2D (wartość = 1, istotność statystyczna oznaczona „*”). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, a następnie testu wielokrotnych porównań Tukey’a ($n = 9$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$; ++++ $p < 0,0001$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$), gdzie „+” oznacza porównanie poziomu ekspresji mRNA w komórkach hodowanych w skafoldach w odniesieniu do hodowli 2D po zastosowaniu czynników stymulujących, zaś „#” oznacza istotność statystyczną poziomu ekspresji mRNA pomiędzy komórkami hodowanymi w skafoldach LP i FB. Prekondycjonowanie nr 1: WJ-MSC 2D przez 24 godz., a następnie WJ-MSC 3D przez 24 godz.; prekondycjonowanie nr 2: WJ-MSC 2D przez 24 godz., a następnie WJ-MSC 3D przez 24 godz. (+TNF α i IFN γ); prekondycjonowanie nr 3: WJ-MSC 2D przez 24 godz. (+TNF α i IFN γ), a następnie WJ-MSC 3D przez 24 godz. (+TNF α i IFN γ).

6.7. Ocena działania neuroprotektoryjnych komórek WJ-MSC

W badaniach *ex vivo* zastosowano eksperymentalny model ischemicznego uszkodzenia skrawków hipokampa szczura poprzez procedurę OGD, czyli czasowe pozbawienie tlenu i glukozy. Imituje to uraz niedokrwienny, a najbardziej wrażliwe komórki w obszarze CA1 hipokampa umierają w ciągu 24 godz. po przeprowadzonej procedurze. Współhodowla uszkodzonych skrawków hipokampa z WJ-MSC umożliwia zatem ocenę zdolności neuroprotektoryjnych komórek mezenchymalnych poprzez analizę redukcji liczby martwych komórek w tym regionie.

Skafoldy LP/FB z komórkami WJ-MSC lub komórki w hodowli 2D umieszczano pod skrawkami i prowadzono współhodowle przez 24 godz. Następnie określano działanie neuroprotekcyjne WJ-MSC oraz poziom ekspresji wybranych neurotrofin i cytokin pro- i przeciwzapalnych w komórkach mezenchymalnych. Ilość komórek wyznakowanych jodkiem propidyny w skrawkach hipokampalnych po OGD oznaczono jako 100% i do tej wartości odnoszono uzyskane wyniki.

Komórki WJ-MSC hodowane w hydrożelowych skafoldach zarówno w warunkach 21 jak i 5% stężenia tlenu wykazują silne działanie protekcyjne względem uszkodzonych skrawków hipokampa szczura (**Ryc.29 A**). Najsilniejszy efekt zaobserwowano po współhodowli z komórkami WJ-MSC hodowanymi w 5% O₂, a następnie wysianymi w skafoldach FB (OGD+WJ-MSC-FB 5% O₂), gdzie śmiertelność komórek w regionie CA1 hipokampa wyniosła 34,6±11,2%. W pozostałych wariantach śmiertelność komórek wyniosła odpowiednio: 59,6±19,9% po współhodowli z WJ-MSC hodowanymi w 5% O₂, a następnie wysianymi w skafoldach LP (OGD+WJ-MSC-LP 5% O₂); 49±10,7% po współhodowli z WJ-MSC hodowanymi w warunkach 21% O₂, a następnie wysianymi w skafoldach LP (OGD+WJ-MSC-LP 21% O₂), oraz 50,4±7,9% po współhodowli z WJ-MSC hodowanymi w warunkach 21% O₂, a następnie wysianymi w skafoldach FB (OGD+WJ-MSC-FB 21% O₂). W grupie kontrolnej (OHC bez OGD) zaobserwowano spontaniczną śmierć komórek z powodu warunków hodowli *in vitro* na poziomie 13,6±3,6% (**Ryc.29 B**).



Ryc.29. Ocena działania neuroprotekcynnego komórek WJ-MSC w eksperymentach *ex vivo*. Obrazy przedstawiają skrawki hipokampa w warunkach kontrolnych (A, a), natomiast po przeprowadzeniu procedury OGD martwe komórki barwione jodkiem propidyny są czarne (A, b-f). Wykres (B) przedstawia liczbę martwych komórek oszacowaną ze skrawków hipokampa (w uszkodzonym regionie CA1), po współhodowli z komórkami WJ-MSC hodowanymi w 5% O₂ lub 21% O₂, a następnie wysianymi w skafoldach z lizatu płytkowego (WJ-MSC-LP) lub fibrynogenu (WJ-MSC-FB). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD ($n = 12$; $***p < 0,001$) w porównaniu do liczby martwych komórek po OGD. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, a następnie testu wielokrotnych porównań Tukey'a. Statystycznie istotna różnica między warunkami hodowli 21% O₂ i 5% O₂ jest oznaczona jako „#” ($\#p < 0,05$), a między rusztowaniami LP i FB oznaczona jako „+” ($+++ p < 0,001$).

6.8. Wpływ współhodowli z uszkodzoną tkanką nerwową na ekspresję komórek WJ-MSC

W komórkach WJ-MSC wysianych w hydrożelach LP oraz FB, a następnie poddanych ekspozycji na środowisko zapalne stworzone przez uszkodzoną tkankę nerwową szczura wykazano zmianę w poziomie ekspresji badanych markerów (**Ryc.30**).

Po współhodowli WJ-MSC z uszkodzonymi skrawkami hipokampa zaobserwowano spadek ekspresji *BDNF* na poziomie mRNA w komórkach WJ-MSC hodowanych w skafoldach LP w porównaniu do 2D w obu warunkach tlenowych. W przypadku hodowli komórek w skafoldach FB, wzrost ekspresji *BDNF* zaobserwowano jedynie w warunkach fizjologicznej normoksji (5% O₂).

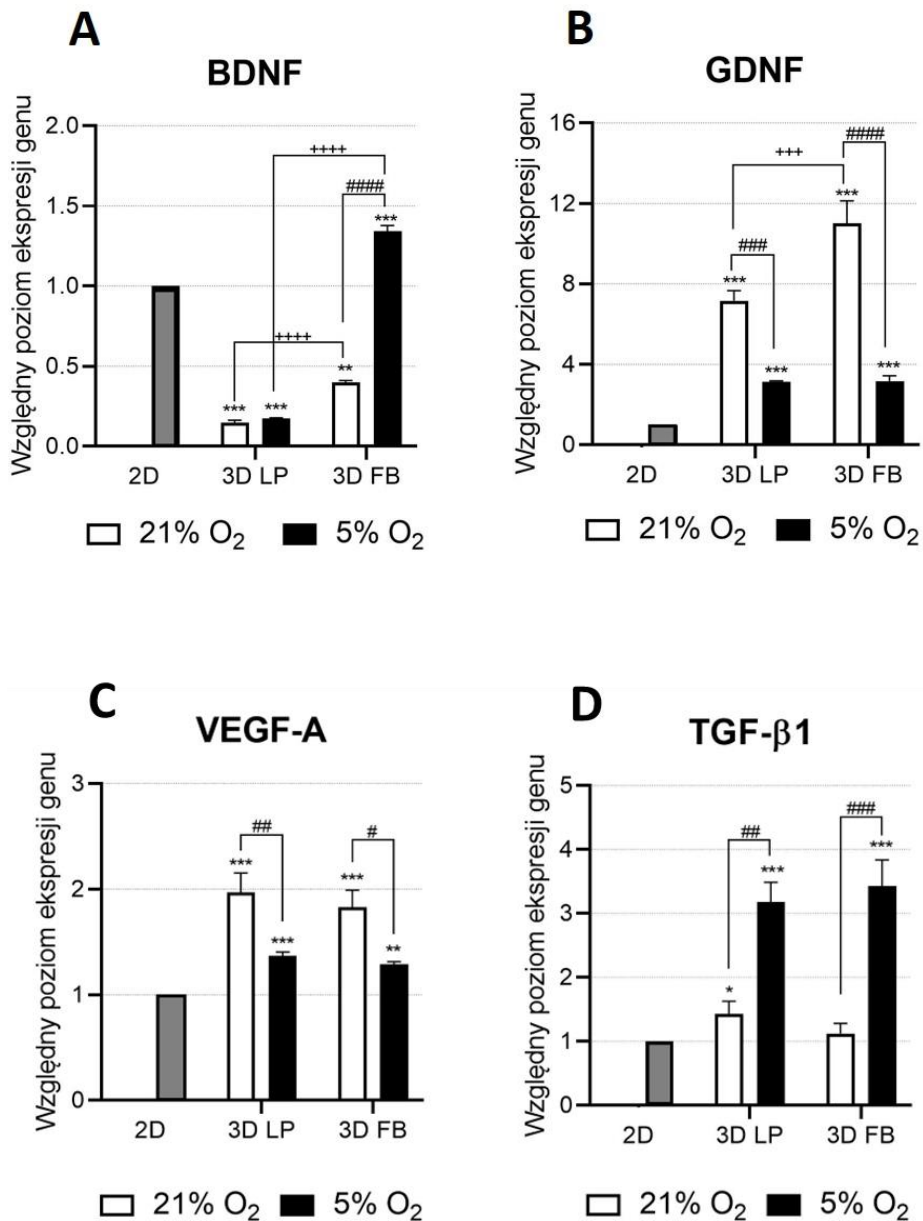
W komórkach WJ-MSC współhodowanych z uszkodzoną tkanką nerwową zaobserwowano wzrost ekspresji *GDNF* po wysianiu komórek w skafoldach LP oraz FB w obu analizowanych warunkach tlenowych. W przypadku hodowli komórek w warunkach 21% O₂ odnotowano wyższy poziom ekspresji *GDNF* niż w warunkach 5% O₂.

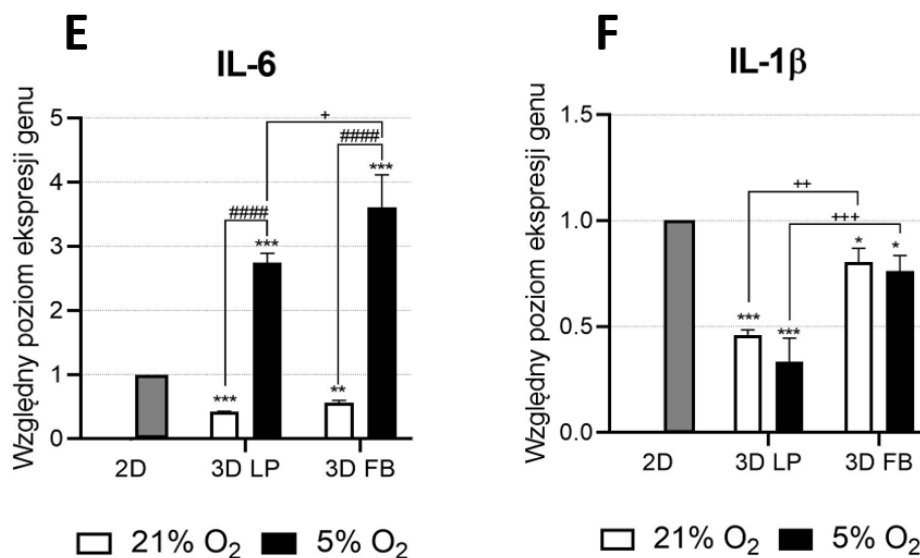
Po współhodowli WJ-MSC z OHC po OGD poziom ekspresji *VEGF-A* uległ zwiększeniu w komórkach hodowanych w skafoldach LP oraz FB w porównaniu do 2D w obu warunkach tlenowych. W przypadku hodowli WJ-MSC w warunkach 21% O₂ odnotowano wyższy poziom ekspresji *VEGF-A* niż w warunkach 5% O₂ w obu typach hydrożeli.

W komórkach WJ-MSC eksponowanych na działanie czynników wydzielanych przez uszkodzoną tkankę nerwową, poziom ekspresji *TGF-β1* uległ zwiększeniu po enkapsulacji komórek w skafoldach w porównaniu do standardowej hodowli 2D w obu warunkach tlenowych. Zaobserwowano ponadto, iż ekspresja *TGF-β1* uległa zwiększeniu w przypadku hodowli WJ-MSC w warunkach fizjologicznej normoksji w obu typach hydrożeli.

Współhodowla WJ-MSC z uszkodzonymi skrawkami hipokampa szczura skutkowała zwiększeniem ekspresji *IL-6* na poziomie mRNA w komórkach WJ-MSC wysianych w skafoldach LP i FB w porównaniu do standardowej hodowli 2D jedynie w warunkach fizjologicznej normoksji. W przypadku hodowli w warunkach tlenu atmosferycznego poziom ekspresji *IL-6* uległ obniżeniu w skafoldach LP i FB.

Dla cytokiny *IL-1 β* zaobserwowano spadek ekspresji w komórkach WJ-MSC po współhodowli z OHC po OGD po wysianiu komórek w skafoldach LP i FB w porównaniu do hodowli w 2D, szczególnie w skafoldach LP. Dodatkowo, w komórkach hodowanych w skafoldach LP zaobserwowano niższy poziom ekspresji *IL-1 β* niż w skafoldach FB, zarówno w warunkach atmosferycznego stężenia tlenu, jak i fizjologicznej normoksji.





Ryc.30. Analiza ekspresji czynników troficznych i cytokin na poziomie mRNA w komórkach WJ-MSC po współhodowli ze skrawkami hipokampa szczura uszkodzonymi w wyniku czasowego pozbawienia tlenu i glukozy (OGD). Względny poziom ekspresji analizowanych genów znormalizowano względem poziomu ekspresji genu referencyjnego ACTB. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD w odniesieniu do warunków kontrolnych 2D (wartość = 1, istotność statystyczna oznaczona „*”). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, a następnie testu wielokrotnych porównań Tukey’a ($n = 9$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$; + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$; ++++ $p < 0,0001$), gdzie „#” oznacza porównanie warunków hodowli 21% O₂ i 5% O₂, podczas gdy „+” oznacza istotność statystyczną poziomu ekspresji mRNA pomiędzy komórkami hodowanymi w skafoldach LP i FB.

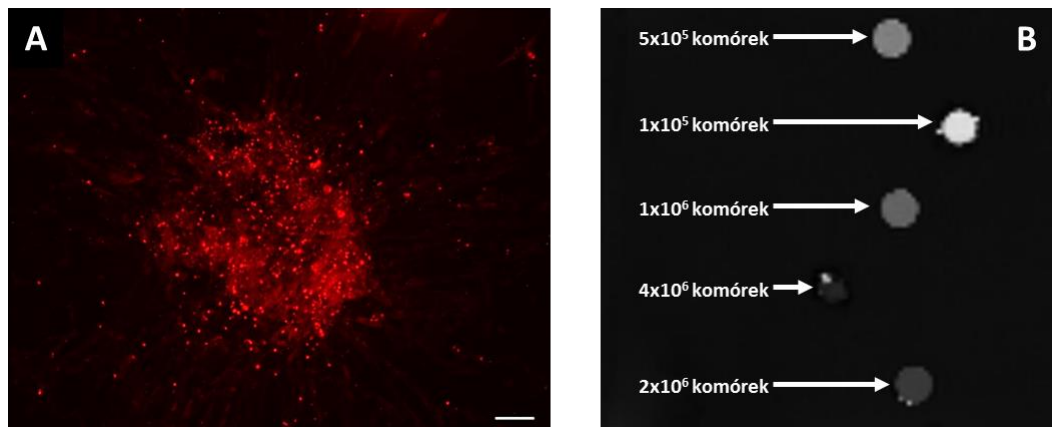
6.9. Wpływ komórek WJ-MSC na odpowiedź organizmu biorcy w eksperymentalnym modelu uszkodzenia mózgu

6.9.1. Analiza uszkodzenia mózgu szczura oraz dystrybucji komórek WJ-MSC po transplantacji

Znakowanie komórek przy użyciu nanocząstek tlenku żelaza (SPIO) pozwala na ich późniejszą wizualizację i analizę dystrybucji w różnym czasie od przeszczepu. Analiza mikroskopowa wykazała wysoką efektywność znakowania komórek przy użyciu nanocząstek tlenku żelaza sprzężonych z rodaminą B w warunkach *in vitro* (**Ryc.31 A**)

Wykonanie badań wstępnych z użyciem fantomu pozwoliło na ustalenie najmniejszej ilości komórek niezbędnej do otrzymania wyraźnego sygnału przy pomocy posiadanego 7T rezonansu magnetycznego (**Ryc.31 B**). Ponadto, w trakcie transplantacji stwierdzono konieczność pozostawienia niewielkiej objętości cieczy

w strzykawce podczas podania komórek zawieszonych w soli fizjologicznej bądź w skafoldach, aby wyeliminować ewentualne dostanie się powietrza do mózgu operowanego zwierzęcia. Dodatkowo, zaobserwowano częściowe cofanie się wstrzykniętej substancji, co ostatecznie skutkuje mniejszą liczbą komórek podanych bezpośrednio do uszkodzonego mózgu szczura. Z tego względu, jak również po badaniach MRI z użyciem fantomu, za optymalną liczbę komórek podawanych do zwierząt uznano 5×10^5 komórek (**Ryc.31 B**).



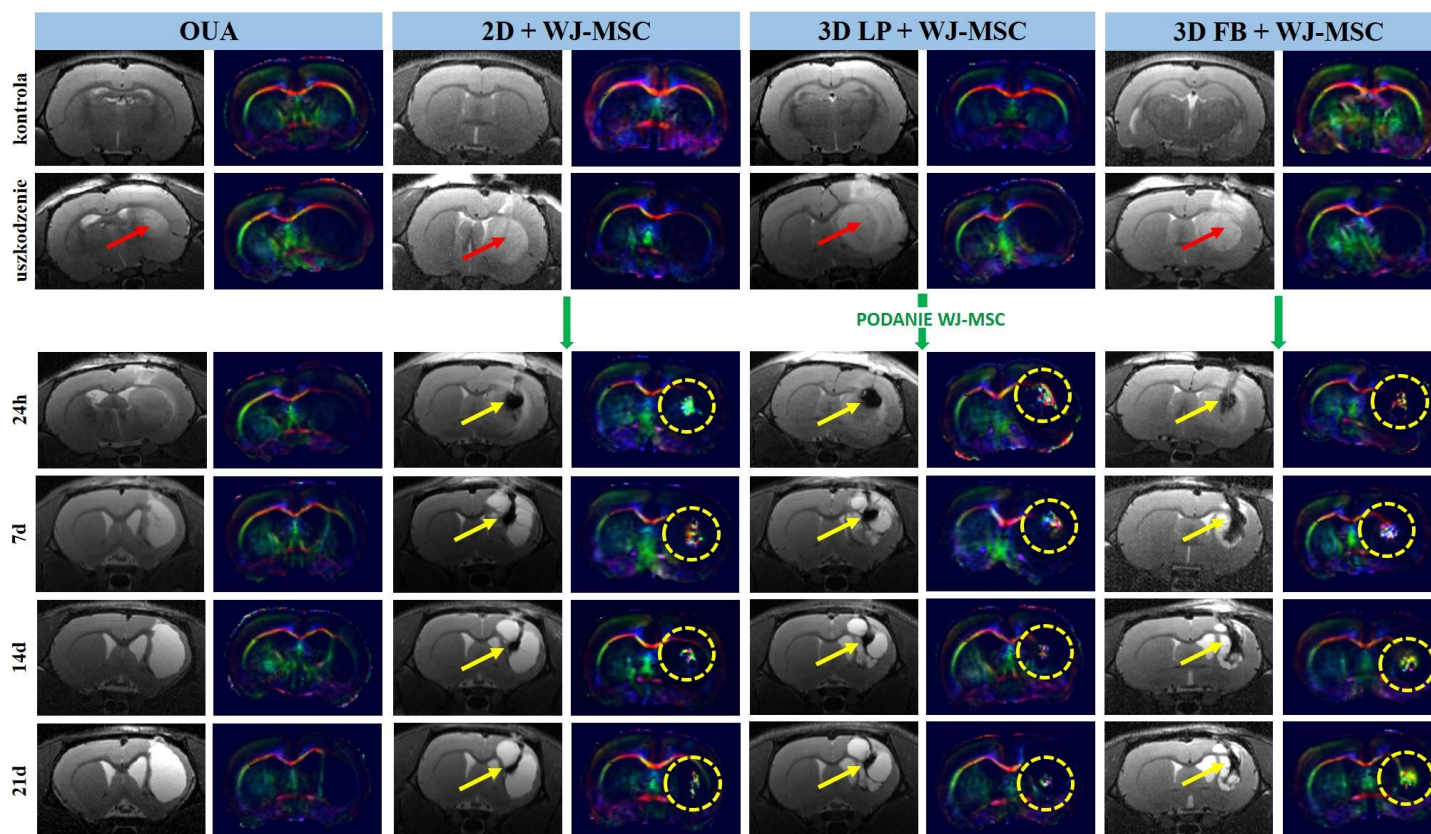
Ryc.31. Zdjęcia przedstawiające komórki WJ-MSC znakowane przy użyciu superparamagnetycznych nanocząstek tlenku żelaza (SPIO) sprzężonych z rodaminą B (A). Probówki z różną liczbą wyznakowanych komórek umieszczono w żelu agarozowym (fantom), a następnie wizualizowano przy użyciu rezonansu magnetycznego. Sygnał różni się w zależności od ilości wyznakowanych komórek (B). Skala = 50 μm .

Po uszkodzeniu ogniskowym, a także po podaniu do zwierząt komórek WJ-MSC oraz w grupach sham wykonano obrazowania TurboRARE-T2 (TR = 5000ms, TE = 30ms (TE = 15ms; RAREfactor = 4; TE_{eff} = 30ms) oraz obrazowania zależne od dyfuzji (DWI, TR = 3750ms, TE = 33ms) w różnych punktach czasowych (24 godz., 7d, 14d, 21d) (**Ryc. 32-33**).

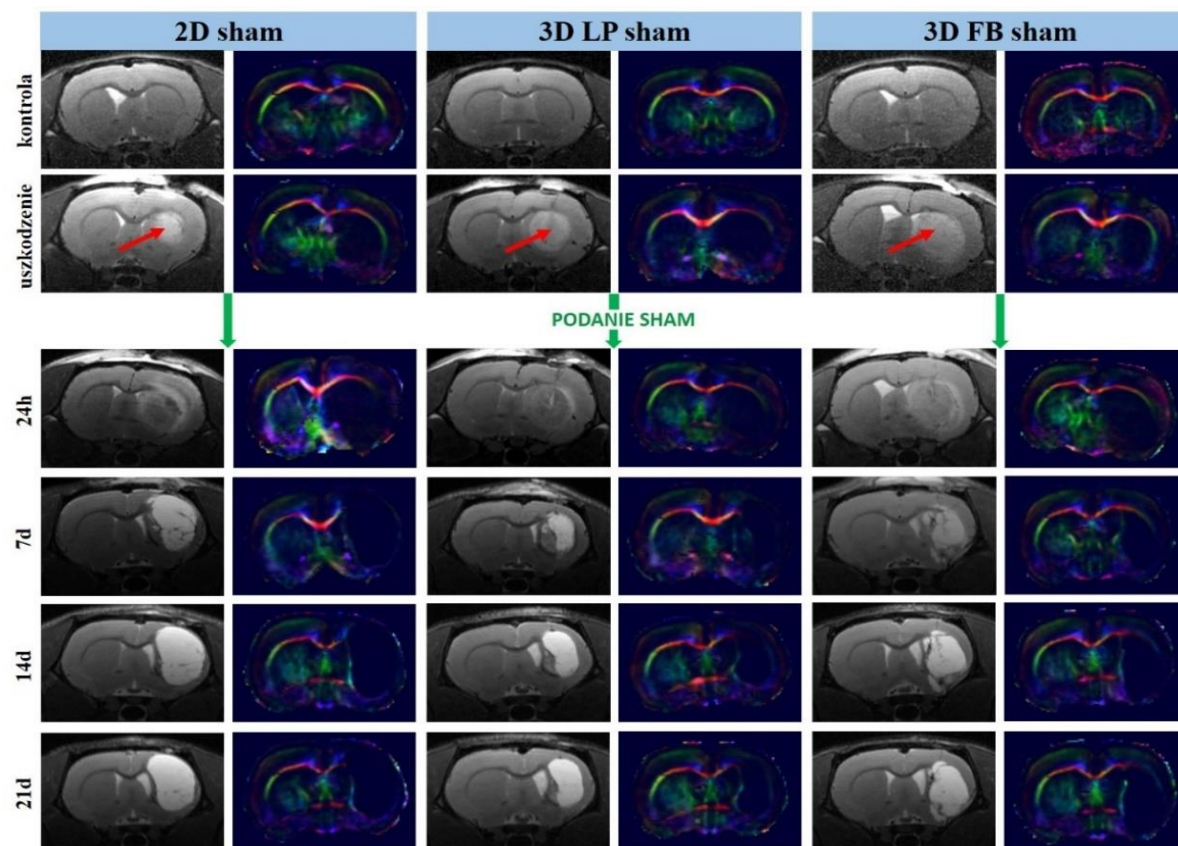
W wyniku iniekcji ouabainy zaobserwowano wyraźne uszkodzenie mózgu w obszarze prążkowiej prawej półkuli (**Ryc. 32-33, czerwone strzałki**). Po weryfikacji wywołania urazu podawano wyznakowane komórki WJ-MSC w miejsce powstałej lezji. Komórki zaobserwowano w miejscu podania (prążkowie) po 24 godz. od transplantacji do uszkodzonego mózgu szczura. Sygnał generowany przez komórki znakowane SPIO (czarny sygnał w miejscu uszkodzenia), zarówno w grupach z komórkami podanymi w formie zawiesiny, jak i hydrożeli (**Ryc.32, żółte strzałki**) utrzymywał się na wysokim poziomie podczas całego eksperymentu. W kolejnych punktach czasowych – 7, 14, 21 dni od

przeszczepu sygnał również można było zaobserwować w miejscu wcześniejszego podania do miejsca uszkodzenia (lezji). Po 24 godz. od przeszczepu znakowane WJ-MSC lokalizowały się w jednym miejscu w obszarze uszkodzenia. Po 7, 14 oraz 21 dniach od podania komórek sygnał generowany przez nanocząstki tlenku żelaza obserwowano w różnych miejscach uszkodzonego prążkowania. Przy tej rozdzielczości obrazowania nie zaobserwowano migracji komórek poza leżnię korowo-prążkowiową, która powstała w wyniku wcześniejszego cytotoksycznego uszkodzenia.

Po uszkodzeniu ogniskowym oraz po podaniu do zwierząt komórek WJ-MSC/sham wykonano również obrazowanie zależne od dyfuzji (DWI) w różnych punktach czasowych (24 godz., 7d, 14d, 21d od podania). Po uszkodzeniu mózgu indukowanym podaniem ouabainy zaobserwowano zanik dyfuzji w obszarze objętym urazem (prawa półkula). W wyniku podania komórek WJ-MSC w miejsce uszkodzenia zaobserwowano wyraźny sygnał w obszarze powstałej lezji (**Ryc.32, żółte okręgi**). Nie odnotowano podobnego wyniku po uszkodzeniu mózgu (OUA) w różnym czasie od powstałego urazu, gdzie nie były podawane komórki WJ-MSC ani po podaniu soli fizjologicznej oraz pustych skafoldów LP i FB (sham) (**Ryc.33**).



Ryc.32. Obrazowanie mózgowia szczurów w sekwencji TurboRARE-T2 ($TR = 5000ms$, $TE = 30ms$ ($TE = 15ms$; $RAREfactor = 4$; $TE_{eff} = 30ms$), kąt odchylenia = 180° , czas trwania = $12m15s$, rozdzielczość = $0.125 \times 0.125 \times 0.5 \text{ mm}$) oraz analiza kierunku dyfuzji cząsteczek wody po uszkodzeniu ogniskowym oraz w następstwie podania komórek WJ-MSC w 2D oraz scaffoldach LP i FB. W obrębie prążkowiec widoczne są obszary objęte uszkodzeniem oraz przeszczepione WJ-MSC wyznakowane nanocząstkami tlenku żelaza, co umożliwia ich detekcję przy użyciu rezonansu magnetycznego. Kolorami zaznaczono następujące kierunki dyfuzji: **czzerwony**: lewo↔prawo, **zielony**: góra↔dół, **niebieski**: tył↔przód.



Ryc.33. Obrazowanie mózgowia szczurów w sekwencji TurboRARE-T2 ($TR = 5000ms$, $TE = 30ms$ ($TE = 15ms$; $RAREfactor = 4$; $TE_{eff} = 30ms$), kąt odchylenia = 180° , czas trwania = $12m15s$, rozdzielczość = $0.125 \times 0.125 \times 0.5 \text{ mm}$) oraz analiza kierunku dyfuzji cząsteczek wody po uszkodzeniu ogniskowym i podaniu samej soli fizjologicznej (2D) oraz pustych skafoldów LP i FB (sham). W obrębie prążkowiec widoczne są obszary objęte uszkodzeniem wywołanym iniekcją ouabainy. Kolorami zaznaczono następujące kierunki dyfuzji: **czzerwony**: lewo↔prawo, **zielony**: góra↔dół, **niebieski**: tył↔przód.

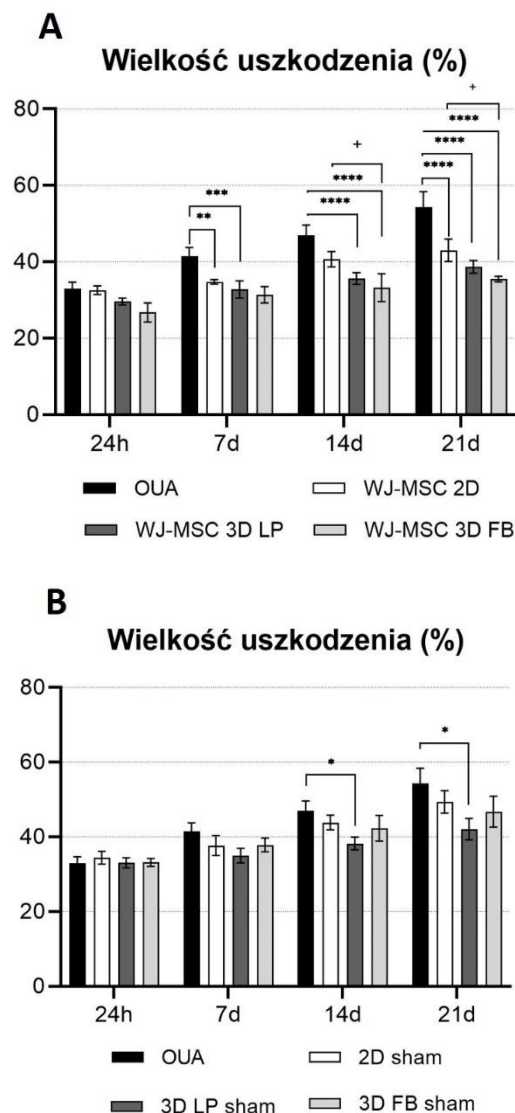
6.9.2. Analiza wielkości uszkodzenia mózgu szczura

Na podstawie wykonanych pomiarów mózgu szczura określono wielkość uszkodzenia w obrębie prążkowiec w różnych punktach czasowych (po 24 godz., 7, 14 i 21 dniach). Po podaniu ouabainy, której działanie imituje zmiany zachodzące w wyniku udaru niedokrwiennego, zaobserwowano wyraźnie zwiększający się obszar uszkodzenia mózgu w trakcie trwania eksperymentu (**Ryc.34**). Po 24 godz. wielkość uszkodzenia wyniosła $32,92 \pm 1,8\%$ powierzchni prawej półkuli, po 7 dniach od wywołania udaru – $41,48 \pm 2,25\%$, po 14 dniach – $46,95 \pm 2,66\%$, zaś po 21 dniach – aż $54,31 \pm 4,03\%$.

W wyniku transplantacji komórek WJ-MSc zaobserwowano istotne zmniejszenie wielkości uszkodzenia. Po 24 godz. od podania komórek WJ-MSc w soli fizjologicznej (2D) wielkość uszkodzenia wynosiła $32,55 \pm 1,13\%$, w przypadku podania komórek w skafoldach LP – $29,62 \pm 0,89\%$, natomiast po podaniu komórek w skafoldach FB – $26,74 \pm 2,51\%$. Po 7 dniach od przeszczepu komórek w 2D obszar uszkodzenia stanowił $34,77 \pm 0,59\%$, po podaniu WJ-MSc w skafoldach LP – $32,77 \pm 2,28\%$, natomiast w skafoldach FB – $31,38 \pm 2,15\%$. Po 14 dniach od podania komórek wielkość urazu wynosiła odpowiednio: $40,68 \pm 1,99\%$ (WJ-MSc 2D), $35,63 \pm 1,55\%$ (WJ-MSc 3D LP) oraz $33,26 \pm 3,66\%$ (WJ-MSc 3D FB). Pod koniec eksperymentu, 21 dni po podaniu komórek w następstwie cytotoksycznego uszkodzenia, obszar urazu zajmował $43,04 \pm 2,94\%$ po podaniu komórek w soli fizjologicznej, $38,71 \pm 1,66\%$ po podaniu WJ-MSc w skafoldach LP oraz $35,48 \pm 0,73\%$ po podaniu komórek w skafoldach FB (**Ryc.34A**). Zaobserwowano istotne zahamowanie uszkodzenia mózgu w następstwie podania komórek WJ-MSc. Dodatkowo, podanie komórek w hydrożelowych skafoldach przyczyniło się ostatecznie do zmniejszenia uszkodzenia mózgu w większym stopniu niż w przypadku przeszczepu komórek w soli fizjologicznej.

Samo zastosowanie tak zwanej operacji pozorowanej (sham), czyli podanie wyłącznie soli fizjologicznej lub pustych skafoldów również wpłynęło na zmniejszenie wielkości urazu mózgu powstałego w wyniku iniekcji ouabainy, jednak w znacznie mniejszym stopniu niż w przypadku transplantacji WJ-MSc w miejsce uszkodzenia. Zaobserwowano tutaj w szczególności pozytywny wpływ samych hydrożelowych skafoldów na redukcję wielkości uszkodzenia.

Po 24 godz. od podania samej soli fizjologicznej (2D) wielkość uszkodzenia wynosiła $34,46 \pm 1,74\%$, w przypadku podania skafoldów LP – $33,08 \pm 1,36\%$, natomiast po podaniu skafoldów FB – $33,16 \pm 1,05\%$. Po 7 dniach od podania soli fizjologicznej obszar uszkodzenia stanowił $37,68 \pm 2,67\%$, po podaniu skafoldów LP – $34,99 \pm 1,95\%$, natomiast skafoldów FB – $37,86 \pm 1,82\%$. Po 14 dniach od podania 2D/3D sham wielkość urazu wynosiła odpowiednio: $43,85 \pm 1,99\%$ (2D sham), $38,25 \pm 1,71\%$ (3D LP sham) oraz $42,31 \pm 3,42\%$ (3D FB sham). Pod koniec eksperymentu, 21 dni po podaniu soli fizjologicznej w następstwie cytotoksycznego uszkodzenia, obszar urazu zajmował $49,38 \pm 3,01\%$, po podaniu skafoldów LP – $42,12 \pm 2,88\%$ oraz $46,76 \pm 4,12\%$ po podaniu skafoldów FB (Ryc.34 B).

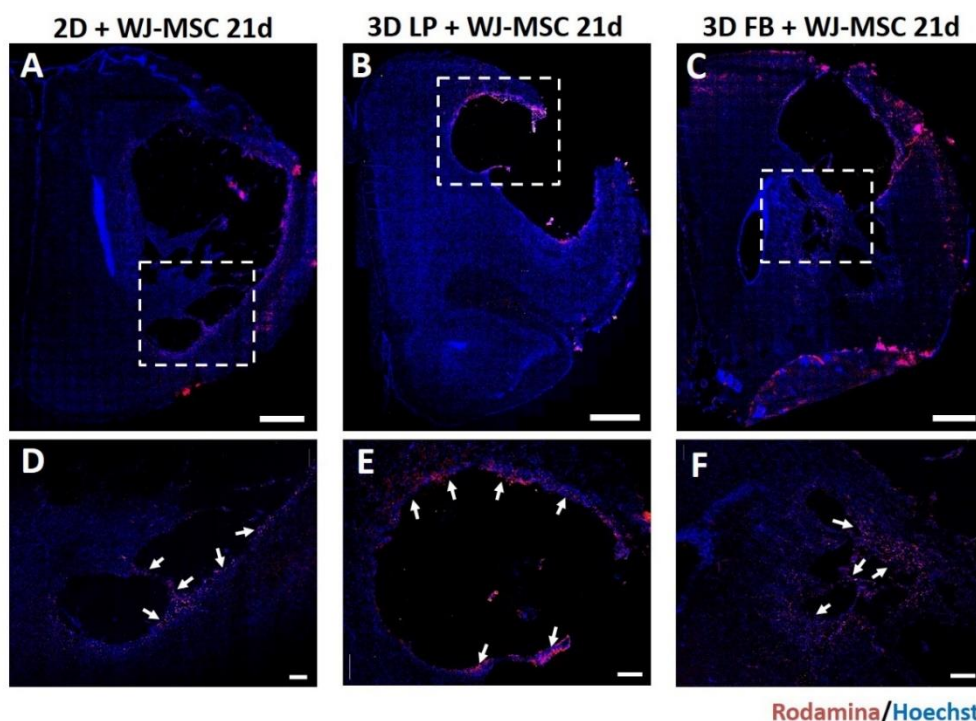


Ryc.34. Analiza wielkości uszkodzenia prądkowia mózgu szczura indukowanego iniekcją ouabainy. Ocena uszkodzonej powierzchni przeprowadzono na podstawie pomiarów morfometrycznych miejsca objętego urazem w odniesieniu do powierzchni całej półkuli.

Analizę przeprowadzono po transplantacji komórek WJ-MSC w soli fizjologicznej (2D) oraz hydrożelowych skafoldach (3D LP, 3D FB) (A), po podaniu samej soli fizjologicznej/pustych skafoldów (sham) (B) oraz po uszkodzeniu ogniskowym bez podania komórek/sham (OUA) w różnych punktach czasowych – po 24 godz., 7, 14 i 21 dniach. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, a następnie testu wielokrotnych porównań Tukey'a w odniesieniu do wielkości uszkodzenia po iniekcji ouabainy bez podania komórek/sham ($n = 3$; $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; $****p < 0,0001$; $+p < 0,05$), gdzie „+” oznacza istotność statystyczną pomiędzy komórkami podanymi w soli fizjologicznej lub skafoldach LP i FB.

6.9.3. Analiza immunohistochemiczna lokalizacji znakowanych nanocząstkami tlenku żelaza WJ-MSC w uszkodzonym mózgu szczura

Przeprowadzono analizę lokalizacji przeszczepionych WJ-MSC w soli fizjologicznej oraz skafoldach wykonanych z lizatu płytkowego lub fibrynogenu po 21 dniach od podania do uszkodzonego mózgu szczura. Sygnał generowany przez nanocząstki tlenku żelaza sprzężone z rodaminą B obserwowano po przeszczepie na granicy powstałej lezji korowo-prążkowiowej, wokół miejsca uszkodzenia (Ryc.35, strzałki). Analiza immunohistochemiczna wykazała ponadto znaczący ubytek tkanki w wyniku powstałego uszkodzenia mózgu.

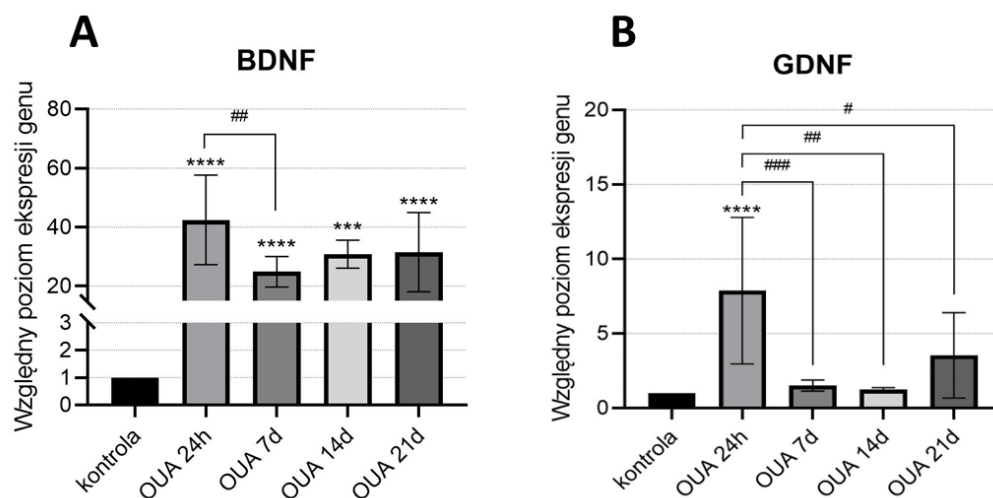


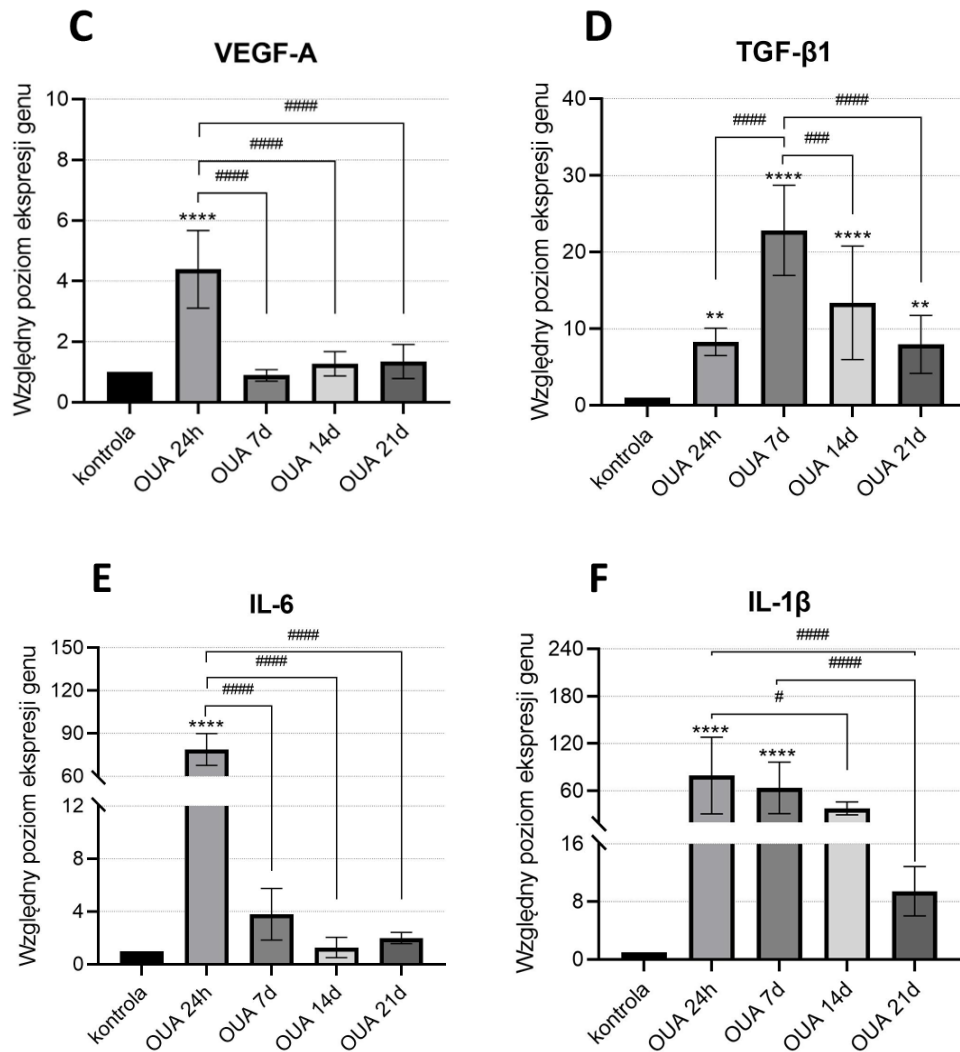
Ryc.35. Analiza dystrybucji nanocząstek tlenku żelaza sprzężonych z rodaminą B w uszkodzonym mózgu szczura po 21 dniach od przeszczepu w zależności od sposobu podania znakowanych WJ-MSC (w soli fizjologicznej lub skafoldach LP oraz FB). Obraz uszkodzonej prawej półkuli mózgu (A-C) oraz powiększenie części uszkodzenia (D-F). Skala: 500 μm (A-C); 200 μm (D-F).

6.9.4. Analiza ekspresji szczurzych cytokin i neurotrofin na poziomie mRNA w następstwie ogniskowego uszkodzenia mózgu w porównaniu z grupą kontrolną

Analizowano poziom ekspresji mRNA szczurzych markerów: *BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*, *TGF- β 1*, *IL-6* oraz *IL-1 β* w różnych punktach czasowych (24 godz., 7, 14, 21 dni) od wywołania uszkodzenia mózgu oraz w mózgu zwierząt kontrolnych, które nie zostały poddane cytotoksycznemu uszkodzeniu. Ocenę poziomu ekspresji powyższych markerów przeprowadzono w prążkowie pobranym z uszkodzonej półkuli mózgu szczura.

W następstwie indukowanego iniekcją ouabainy uszkodzenia mózgu zaobserwowano zwiększoną ekspresję wszystkich analizowanych markerów w porównaniu do kontroli (**Ryc.36**). Znaczny wzrost *BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*, *IL-6*, *IL-1 β* zaobserwowano głównie po 24 godz. od momentu uszkodzenia, natomiast ekspresja przeciwzapalnego *TGF- β 1* najbardziej wzrosła po 7 dniach od powstałego urazu mózgu. Ekspresja *BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A* oraz *IL-6* po 7, 14 i 21 dniach utrzymywała się na porównywalnym poziomie, natomiast w przypadku prozapalnej *IL-1 β* najwyższą ekspresję zaobserwowano po 24 godz. od uszkodzenia, z sukcesywnym obniżaniem poziomu ekspresji w kolejnych dniach analizy. Podobny efekt zaobserwowano dla ekspresji *TGF- β 1*. We wszystkich analizowanych punktach czasowych ekspresja badanych markerów utrzymywała się na znacznie wyższym poziomie niż zaobserwowano w kontroli.





Ryc.36. Analiza ekspresji szczurzych czynników troficznych i cytokin na poziomie mRNA w uszkodzonym mózgu szczura w różnych punktach czasowych (po 24 godz., 7, 14 i 21 dniach). Względny poziom ekspresji analizowanych genów znormalizowano względem poziomu ekspresji genu referencyjnego GAPDH. Wyniki przedstawiono jako średnie ± SD w odniesieniu do poziomu ekspresji obserwowanej w mózgu zwierząt kontrolnych (wartość = 1, istotność statystyczna oznaczona „*”). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, a następnie testu wielokrotnych porównań Tukey’a ($n = 12$; $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; $****p < 0,0001$; $\#p < 0,05$; $##p < 0,01$; $###p < 0,001$; $####p < 0,0001$), gdzie „#” oznacza porównanie poziomu ekspresji w prążkowie mózgu szczura po uszkodzeniu ogniskowym w różnych punktach czasowych.

6.9.5. Analiza ekspresji szczurzych cytokin i neurotrofin na poziomie mRNA w następstwie uszkodzenia mózgu oraz po transplantacji WJ-MSC

Analizowano poziom ekspresji mRNA szczurzych markerów: *BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*, *TGF-β1*, *IL-6* oraz *IL-1β* w różnych punktach czasowych (24 godz., 7, 14, 21 dni) od wywołania uszkodzenia mózgu oraz w następstwie

podania komórek WJ-MSC w soli fizjologicznej (2D) lub hydrożelowych skafoldach LP lub FB. Komórki przed podaniem do uszkodzonego mózgu szczura były hodowane w różnych warunkach tlenowych: 21% O₂ lub 5% O₂ w celu ich wstępnego prekondycjonowania przed przeszczepem. Ocenę poziomu ekspresji wymienionych markerów przeprowadzono w prążkowi pobranym z uszkodzonej półkuli mózgu szczura (**Ryc.37**).

Po 24 godz. od podania komórek WJ-MSC nie zaobserwowano wzrostu ekspresji szurzego *BDNF* w uszkodzonym prążkowi szczura niezależnie od sposobu podania komórek (w soli fizjologicznej lub skafoldach) oraz warunków hodowli WJ-MSC przed przeszczepem (21% O₂ vs. 5% O₂). Wzrost ekspresji *BDNF* zaobserwowano natomiast po 7 dniach od podania komórek w porównaniu do kontroli (uszkodzenie OUA bez podania WJ-MSC/sham). Taki sam efekt zaobserwowano po 14 dniach i utrzymywał się również po 21 dniach od podania komórek WJ-MSC. Sposób podania WJ-MSC oraz warunki hodowli *in vitro* przed podaniem nie wpłynęły znacząco na ekspresję *BDNF*, jednak największy wzrost ekspresji w porównaniu do uszkodzonego mózgu szczura zaobserwowano po 21 dniach i podaniu komórek w skafoldzie LP, hodowanych wcześniej w warunkach fizjologicznej normoksji (5% O₂).

Analiza ekspresji neurotrofiny *GDNF* wykazała, podobnie jak w przypadku *BDNF*, brak wzrostu poziomu ekspresji w uszkodzonym prążkowi szczura po 24 godz. od podania komórek WJ-MSC niezależnie od sposobu ich podania oraz warunków hodowli WJ-MSC przed przeszczepem. Natomiast po 7 dniach od podania komórek zaobserwowano wzrost ekspresji *GDNF* w porównaniu do uszkodzonego mózgu szczura (OUA, gdzie nie zostały przeszczepione komórki). Po 14 oraz 21 dniach od podania WJ-MSC zaobserwowano podobny efekt – ekspresja *GDNF* utrzymywała się na wyższym poziomie niż w kontroli (OUA). Ponadto, najwyższy poziom ekspresji zaobserwowano w uszkodzonym prążkowi szczura po podaniu komórek w skafoldach w porównaniu do komórek podanych w soli fizjologicznej, szczególnie w przypadku skafoldów wykonanych z lizatu płytkowego. Dodatkowo, wcześniejsze prekondycjonowanie komórek w warunkach fizjologicznej normoksji również wpłynęło na wzrost ekspresji *GDNF* w uszkodzonym prążkowi szczura w porównaniu do efektu zaobserwowanego po przeszczepie komórek hodowanych w warunkach 21% O₂.

Po 24 godz. od podania komórek WJ-MSC nie zaobserwowano wzrostu ekspresji *VEGF-A* w uszkodzonym prążkowie szczura niezależnie od sposobu podania komórek (w soli fizjologicznej lub hydrożelowych skafoldach) oraz warunków hodowli WJ-MSC przed przeszczepem (21% O₂ vs. 5% O₂). Wzrost ekspresji *VEGF-A* zaobserwowano natomiast w uszkodzonym prążkowie szczura po 7 dniach od podania komórek WJ-MSC w porównaniu do kontroli (OUA bez WJ-MSC). Podobny efekt zaobserwowano po 14 i 21 dniach od podania WJ-MSC. Warunki hodowli komórek *in vitro* przed przeszczepem nie miały znaczącego wpływu na zmiany poziomu ekspresji szczurzego *VEGF-A*, natomiast zaobserwowano różnice w zależności od sposobu podania WJ-MSC do mózgu szczura. W przypadku przeszczepu komórek w skafoldach (szczególnie rusztowaniach LP) odnotowano wzrost ekspresji *VEGF-A* w porównaniu do poziomu ekspresji obserwowanego w uszkodzonym prążkowie w następstwie podania komórek w soli fizjologicznej.

Analiza ekspresji *TGF-β1* wykazała wyraźny wzrost już po 24 godz. od podania komórek WJ-MSC do uszkodzonego mózgu szczura. Jednocześnie, najwyższy poziom ekspresji zaobserwowano po podaniu komórek hodowanych przed przeszczepem w warunkach fizjologicznej normoksji oraz podanych w skafoldach. Po 7, 14 oraz 21 dniach od podania WJ-MSC do prążkowie szczura zaobserwowano podobną zależność – poziom ekspresji *TGF-β1* wzrósł po podaniu komórek w porównaniu do poziomu ekspresji obserwowanego w uszkodzonym mózgu szczura. Ponadto, w kolejnych punktach czasowych zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji szczurzego *TGF-β1* w następstwie podania komórek w hydrożelowych skafoldach w porównaniu do przeszczepu WJ-MSC w soli fizjologicznej, szczególnie w przypadku podania komórek w rusztowaniach LP. Dodatkowo, po przeszczepie komórek hodowanych w warunkach fizjologicznej normoksji odnotowano wyższą ekspresję *TGF-β1* w uszkodzonym prążkowie szczura niż w przypadku podania komórek hodowanych w warunkach 21% O₂.

Poziom ekspresji *IL-6* w uszkodzonym prążkowie szczura utrzymywał się na podobnym poziomie w kolejnych punktach czasowych eksperymentu. Jednocześnie, zaobserwowano spadek ekspresji *IL-6* w następstwie podania komórek WJ-MSC w porównaniu do kontroli (OUA), zarówno po 24 godz. jak i po 7, 14 oraz 21 dniach od przeszczepu. Najniższy poziom ekspresji w porównaniu do OUA zaobserwowano po 24 godz. od podania komórek WJ-MSC. Wzrost ekspresji

IL-6 odnotowano jedynie w przypadku 14 dni od podania komórek w skafoldach FB, które przed przeszczepem były hodowane w warunkach 5% O₂.

Po 24 godz. od podania komórek WJ-MSC do uszkodzonego prążkowiec szczura zaobserwowano spadek ekspresji prozapalnej *IL-1β* w porównaniu do poziomu ekspresji obserwowanego w grupie kontrolnej (OUA). Znaczny spadek ekspresji szczurzej *IL-1β* zaobserwowano głównie po podaniu komórek hodowanych w warunkach fizjologicznej normoksji, a następnie przeszczepionych w skafoldach wykonanych z lizatu płytkowego. Po 7 oraz 14 dniach od podania komórek w hydrożelowych skafoldach LP lub FB, poziom ekspresji *IL-1β* nieznacznie wzrósł w porównaniu do poziomu ekspresji obserwowanego w uszkodzonym prążkowiec szczura, gdzie nie zostały podane WJ-MSC. Gwałtowny wzrost ekspresji *IL-1β* zaobserwowano natomiast w przypadku podania komórek zawieszonych w soli fizjologicznej (2D) w porównaniu do poziomu ekspresji odnotowanego po podaniu komórek w skafoldach, szczególnie gdy WJ-MSC przed przeszczepem były hodowane w warunkach 21% O₂. Po 21 dniach od podania komórek w soli fizjologicznej do uszkodzonego prążkowiec szczura nadal utrzymywał się wysoki poziom ekspresji *IL-1β*. Wzrósł również poziom ekspresji tej interleukiny w przypadku przeszczepu WJ-MSC w skafoldach wykonanych z lizatu płytkowego. Po 3 tygodniach od przeszczepu najniższy poziom ekspresji szczurzej *IL-1β* odnotowano po podaniu komórek w skafoldach fibrynowych.

W przypadku grup sham nie zaobserwowano wzrostu poziomu ekspresji *BDNF* po 24 godz. od podania do uszkodzonego mózgu szczura. Po 7 dniach obserwowana ekspresja była na niższym poziomie niż w przypadku podania komórek WJ-MSC. Po 14 oraz 21 dniach poziom ekspresji w grupach sham był na porównywalnym poziomie jak w przypadku podania WJ-MSC.

Poziom ekspresji szczurzej *GDNF* w grupach sham po 24 godz., 7 i 14 i 21 dniach od podania utrzymywał się na niższym poziomie niż w przypadku ekspresji obserwowanej w uszkodzonym mózgu (OUA) oraz po przeszczepie komórek w soli fizjologicznej i hydrożelach.

W grupach sham 24 godz. po podaniu soli fizjologicznej/pustych skafoldów zaobserwowano spadek ekspresji *VEGF-A* w porównaniu do poziomu ekspresji w uszkodzonym mózgu szczura (OUA). Po 7, 14 i 21 dniach poziom ekspresji

VEGF-A po podaniu sham był porównywalny, jak w przypadku przeszczepu komórek WJ-MSC.

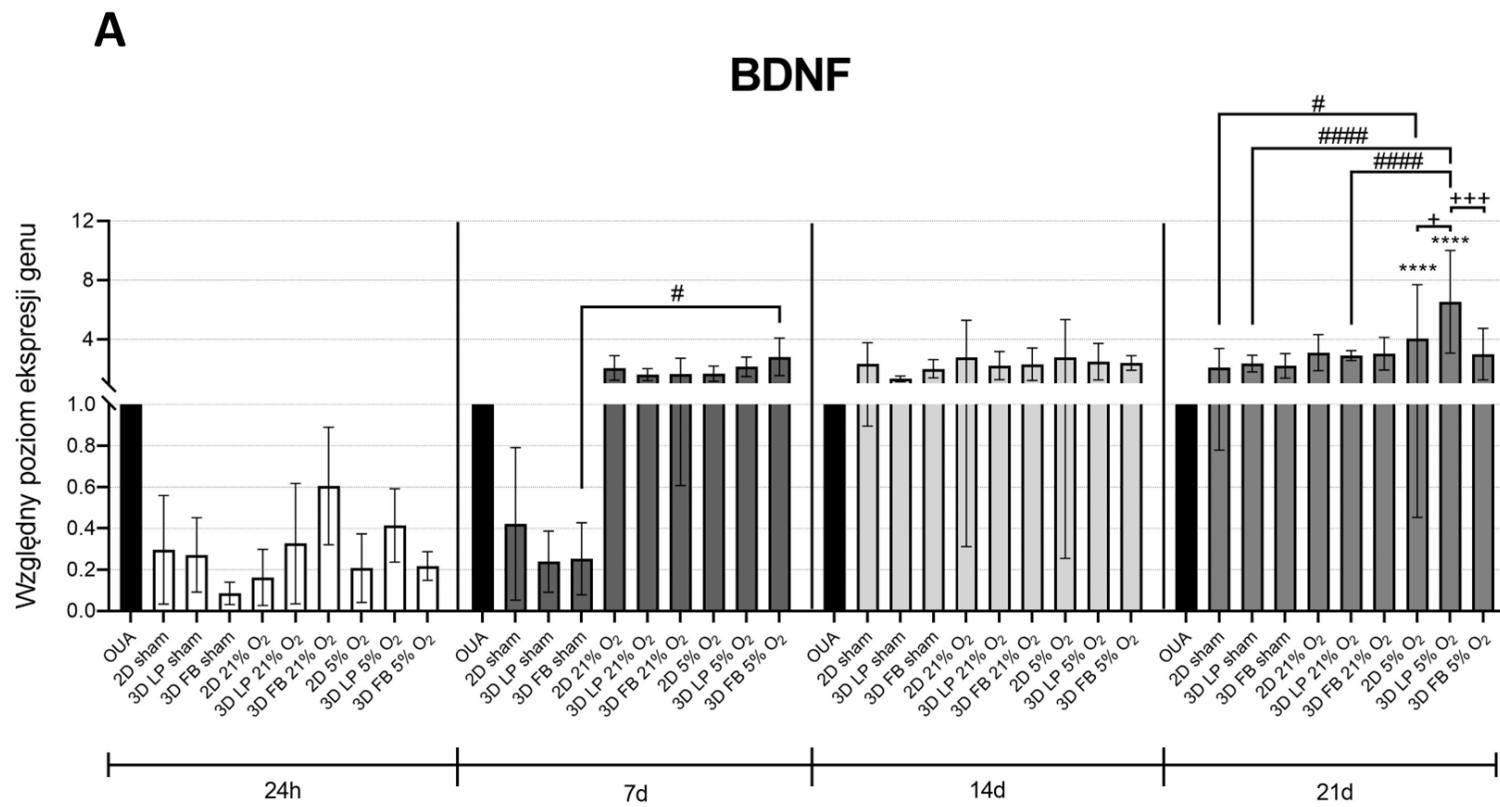
Ekspresję *TGF-β1* 24 godz. po podaniu sham odnotowano na wyższym poziomie niż w uszkodzonym mózgu szczura (OUA) oraz porównywalnym do grup eksperymentalnych, gdzie były podawane komórki WJ-MSC. Po 7 dniach od podania jedynie w grupie 3D LP sham zaobserwowano wyższą ekspresję w porównaniu do OUA. Najniższy poziom ekspresji *TGF-β1* odnotowano po podaniu soli fizjologicznej oraz skafoldów FB. Po 14 i 21 dniach od podania sham, poziom ekspresji *TGF-β1* obserwowano na niższym poziomie niż w grupie OUA oraz w wyniku przeszczepu WJ-MSC.

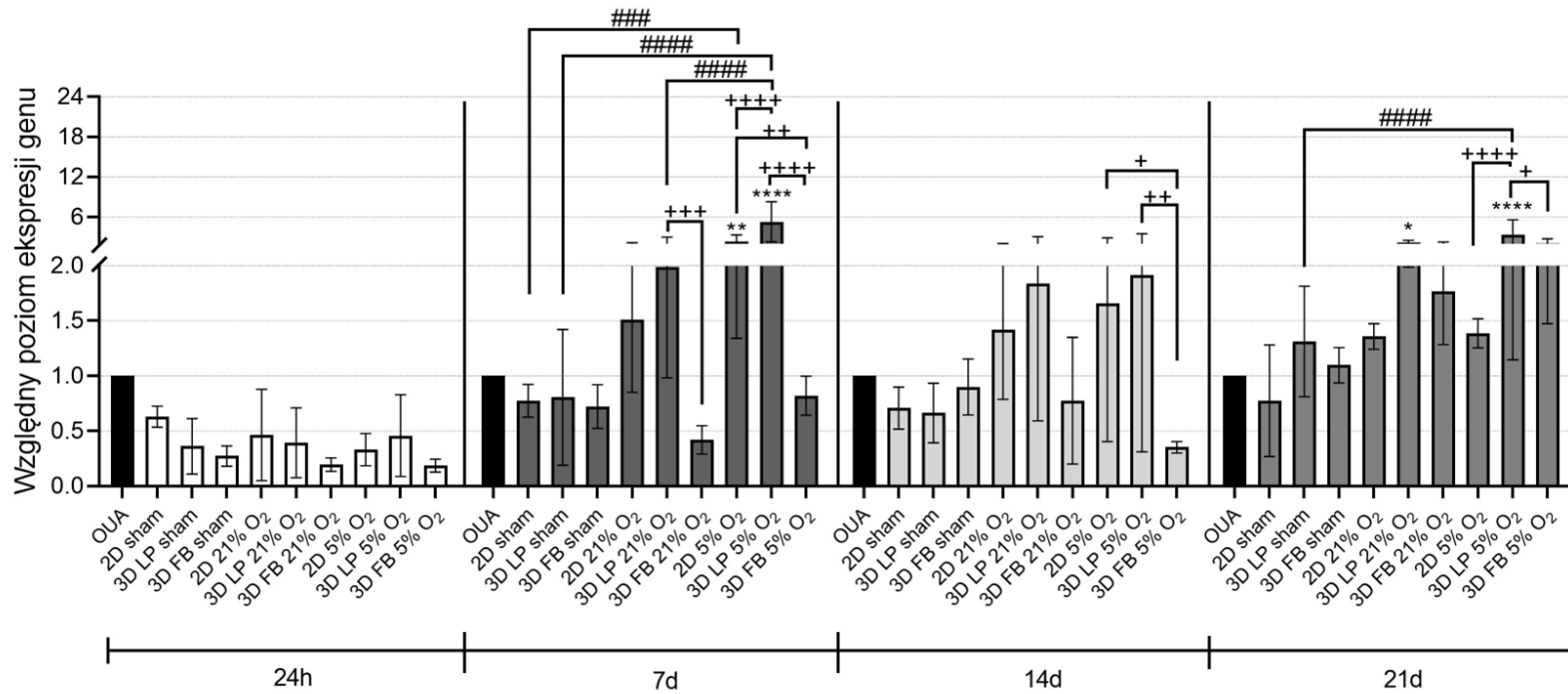
W grupach sham zaobserwowano spadek ekspresji *IL-6* w porównaniu do grup OUA po 24 godz., 7, 14 i 21 dniach od podania. Po 7 dniach od podania soli fizjologicznej poziom ekspresji *IL-6* był niższy niż po podaniu WJ-MSC, szczególnie hodowanych w 21% O₂. W przypadku grupy 3D FB sham poziom ekspresji *IL-6* zaobserwowano na wyższym poziomie niż po podaniu komórek WJ-MSC w skafoldach FB. Po 14 dniach w grupie 3D LP sham poziom ekspresji *IL-6* odnotowano na wyższym poziomie niż w przypadku podania komórek w skafoldach LP. W grupie 3D FB sham zaobserwowano odwrotną tendencję – poziom ekspresji *IL-6* był niższy, niż po podaniu komórek w skafoldach FB. Po 21 dniach poziom ekspresji *IL-6* utrzymywał się na podobnym poziomie we wszystkich badanych grupach.

Ekspresja *IL-1β* w grupach sham 24 godz. po podaniu soli fizjologicznej/pustych skafoldów była obserwowana na porównywalnym poziomie, jak w przypadku podania komórek WJ-MSC. Wyraźne różnice w poziomie ekspresji zaobserwowano po 7, 14 i 21 dniach, głównie w grupach 2D sham, gdzie po podaniu komórek WJ-MSC w 2D poziom ekspresji *IL-1β* był znacząco wyższy niż po podaniu samej soli fizjologicznej.

Dla ułatwienia interpretacji wyników dotyczących poziomu ekspresji badanych genów w mózgu szczura po uszkodzeniu ogniskowym i transplantacji komórek WJ-MSC/sham, te same wyniki przedstawiono w dwóch różnych odniesieniach eksperymentalnych – względem zmian ekspresji określonych czynników troficznych i cytokin w kolejnych punktach czasowych (**Ryc.37**) oraz względem porównania zmian wszystkich badanych cytokin obserwowanych w różnych punktach czasowych od przeszczepu komórek/sham – **Ryc.38**).

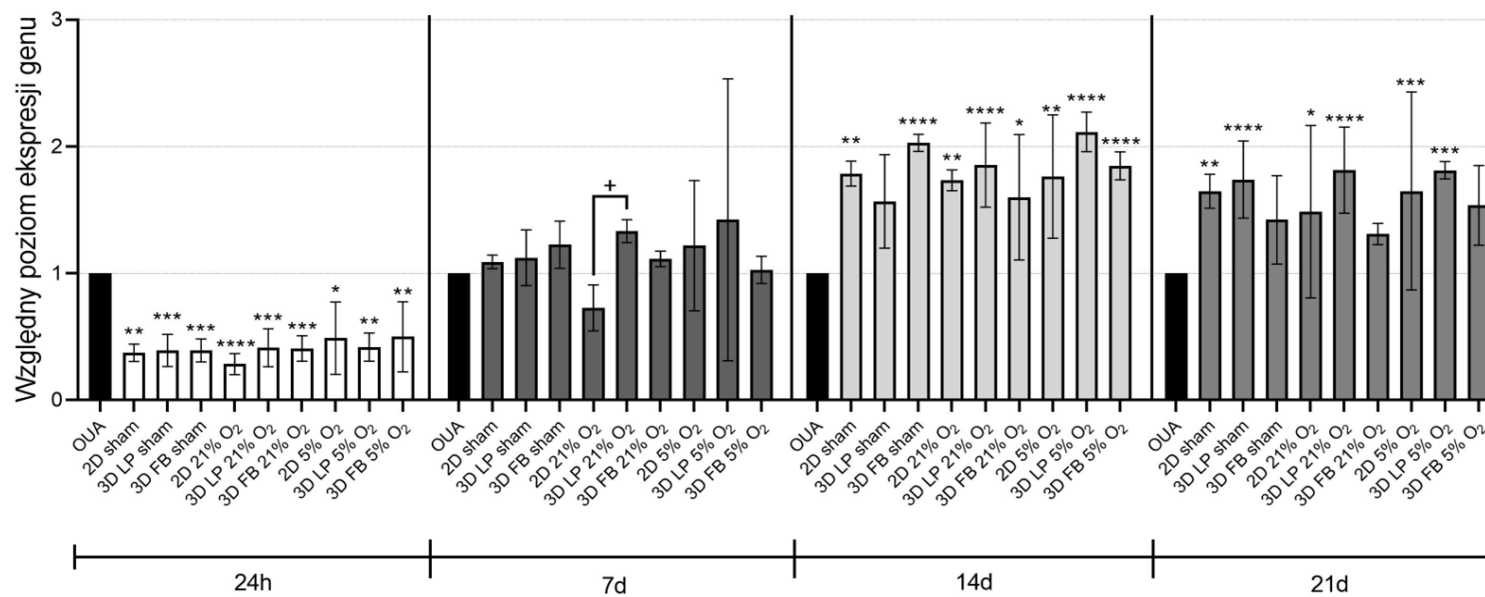
Takie przedstawienie wyników pozwala zaobserwować, że podanie w miejsce uszkodzenia komórek WJ-MSC w pierwszej kolejności (po 24 godz.) hamuje wydzielanie prozapalnej *IL-6* oraz *IL-1 β* oraz stymuluje wydzielanie przeciwzapalnego *TGF- β 1*. Następnie (po 7 i 14 dniach od przeszczepu) obserwowana była aktywacja neurotrofin (*BDNF*, *GDNF*), natomiast dopiero po 14 i 21 dniach stwierdzono wzrost ekspresji czynnika stymulującego angiogenezę – *VEGF-A* (**Ryc.38**).

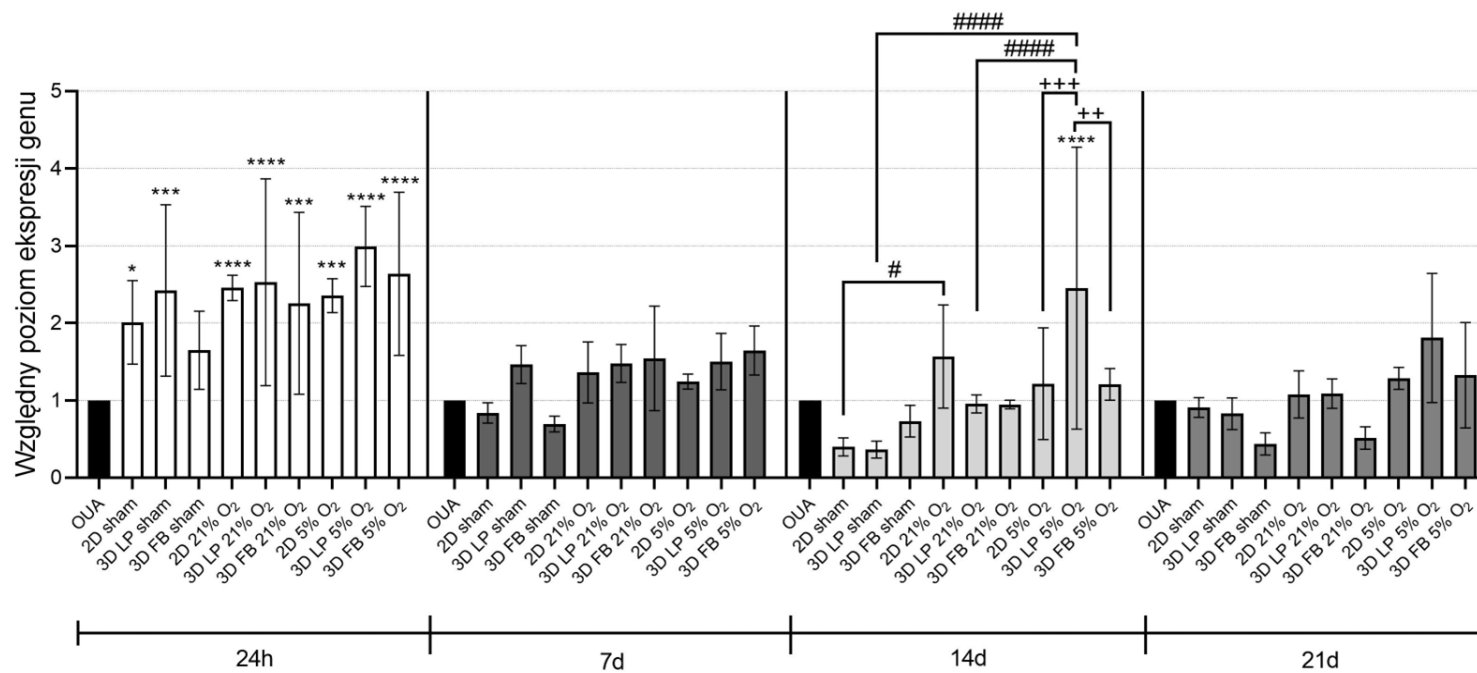


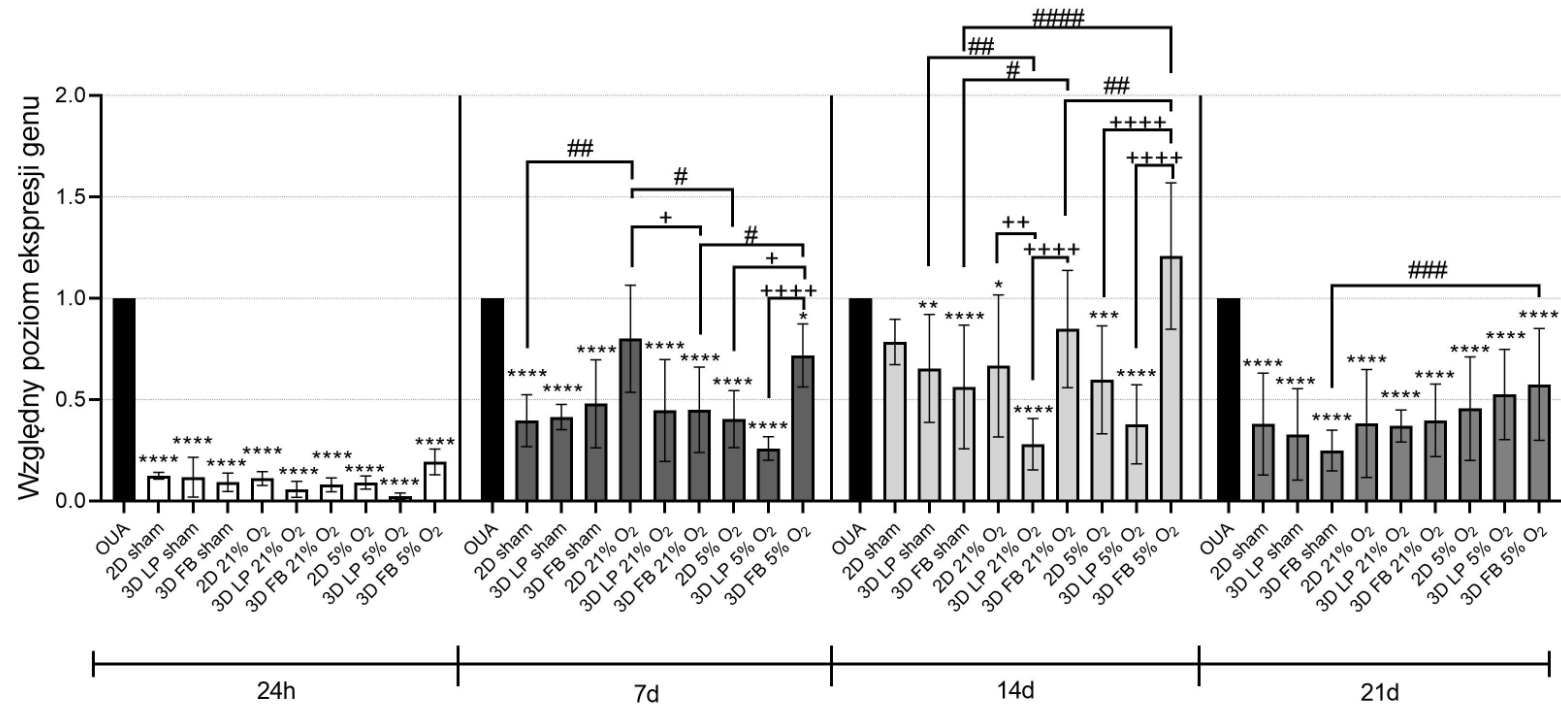
B**GDNF**

C

VEGF-A

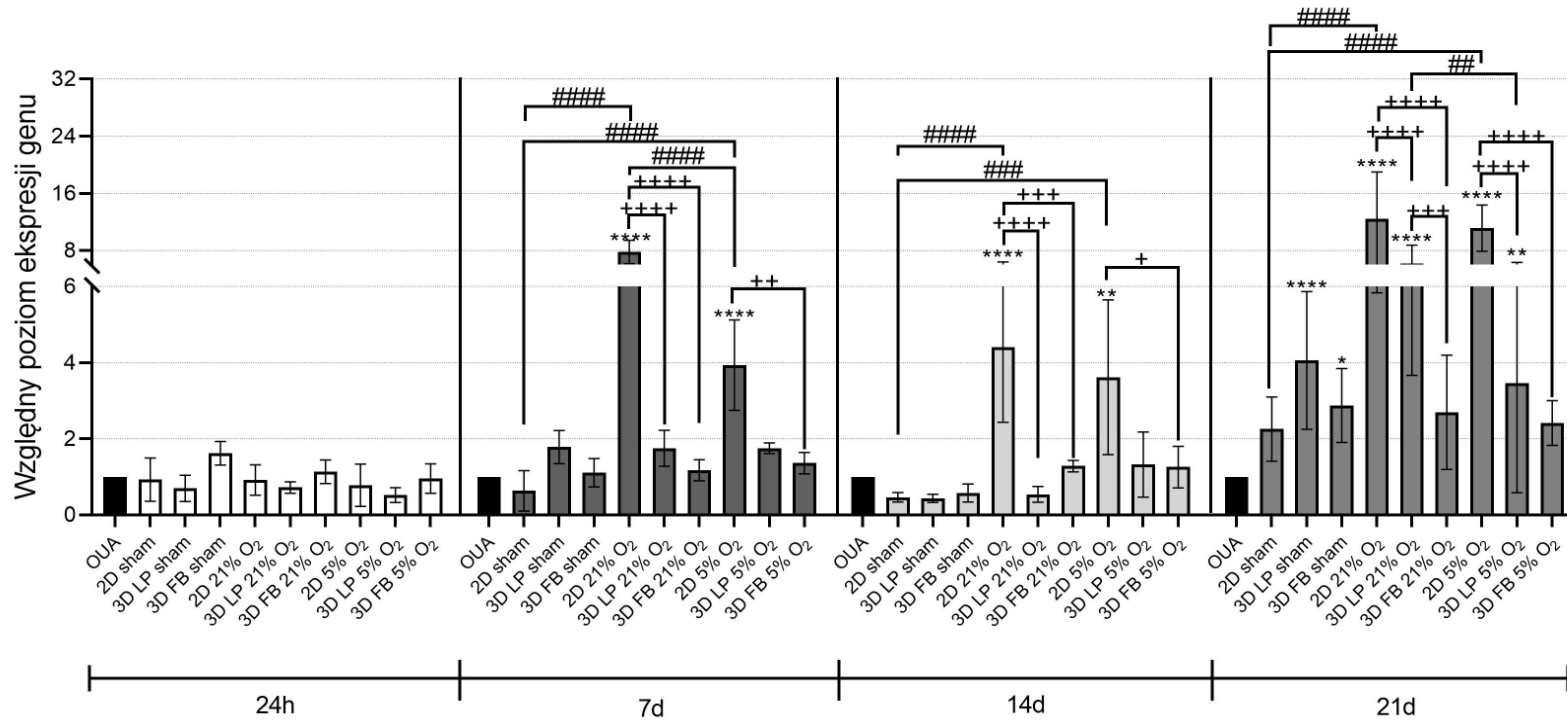


D**TGF- β 1**

E**IL-6**

F

IL-1 β

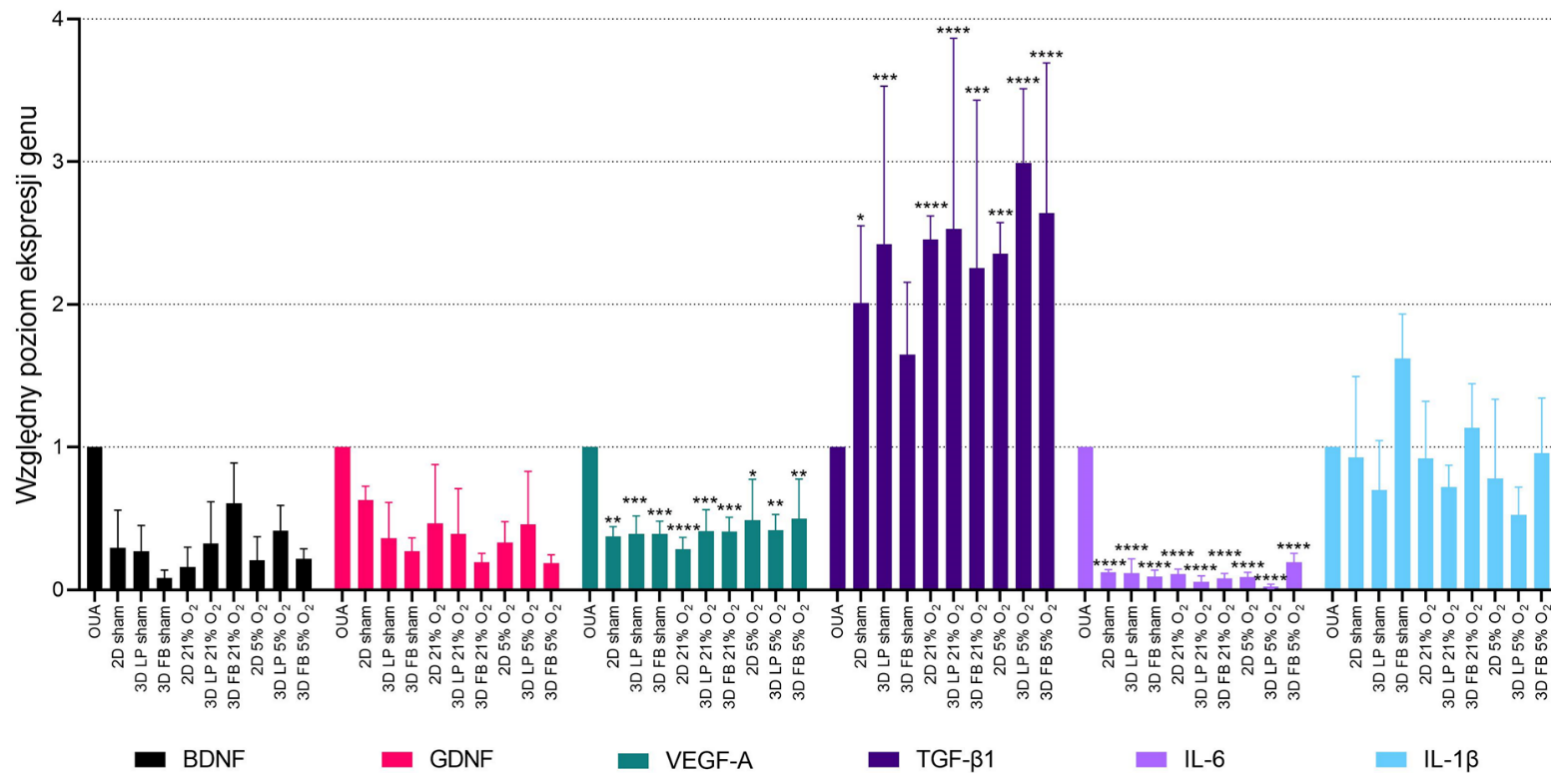


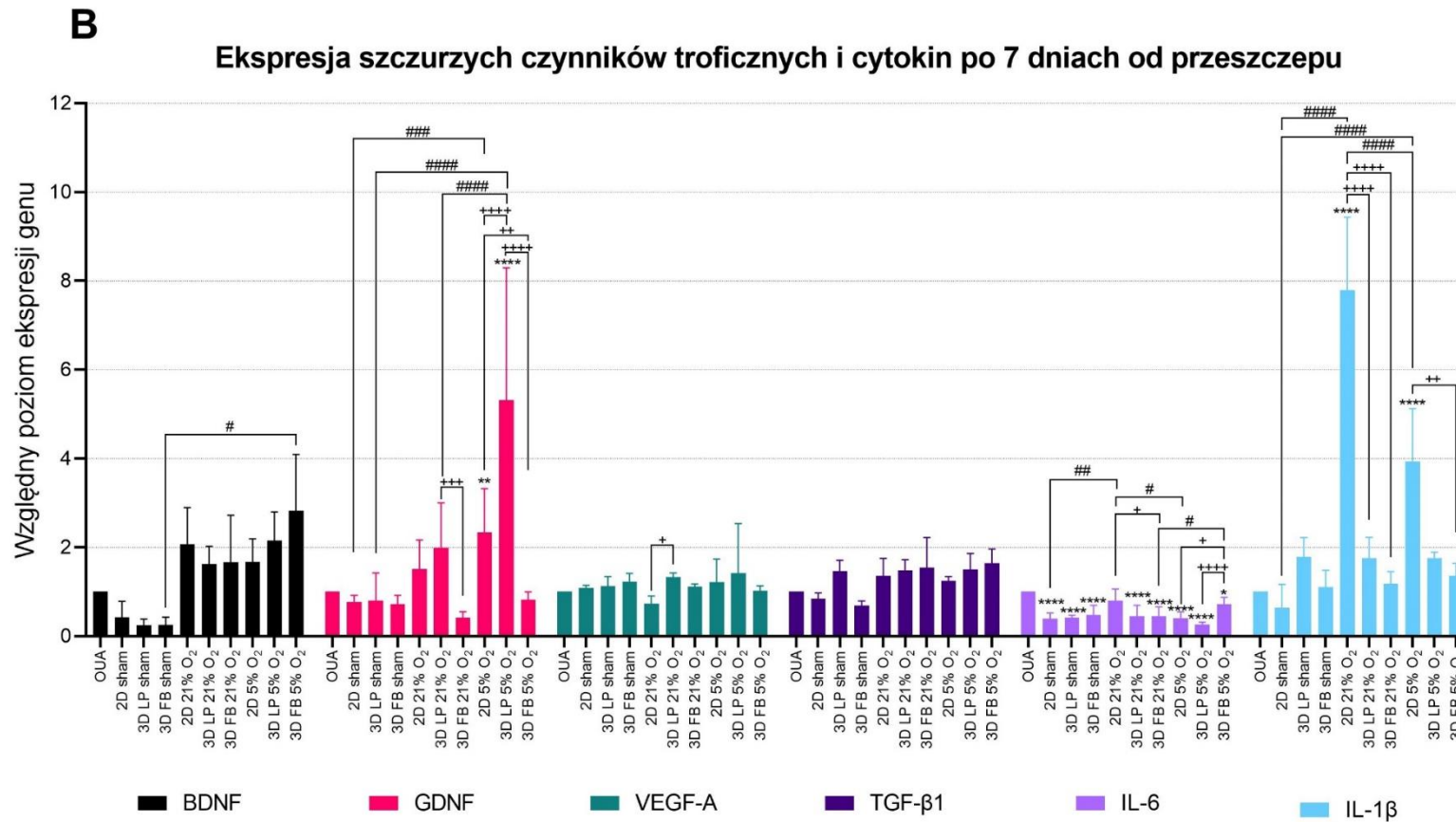
Ryc.37. Analiza ekspresji poszczególnych szczurzych czynników troficznych i cytokin na poziomie mRNA w uszkodzonym mózgu szczura, po podaniu komórek WJ-MSC hodowanych w warunkach 21% O₂ lub 5% O₂, a następnie przeszczepionych w soli fizjologicznej (2D) lub hydrożelowych skafoldach (3D LP i 3D FB) oraz po podaniu samej soli fizjologicznej/pustych skafoldów (sham) w kolejnych punktach czasowych (po 24 godz., 7, 14 i 21 dniach). Względny poziom ekspresji analizowanych genów znormalizowano względem poziomu ekspresji genu referencyjnego GAPDH. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD w odniesieniu do poziomu ekspresji obserwowanej w mózgu zwierząt po uszkodzeniu ogniskowym – OUA (wartość = 1, istotność statystyczna oznaczona „*”). Analizę

statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, a następnie testu wielokrotnych porównań Tukey'a ($n = 12$; $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; $****p < 0,0001$; $\#p < 0,05$; $\#\#p < 0,01$; $\#\#\#p < 0,001$; $\#\#\#\#p < 0,0001$; $+p < 0,05$; $++p < 0,01$; $+++p < 0,001$; $++++p < 0,0001$), gdzie „#” oznacza porównanie poziomu ekspresji w uszkodzonym prążkowie szczura w zależności od podania komórek WJ-MSC hodowanych w różnych warunkach tlenowych, zaś „+” oznacza porównanie poziomu ekspresji w uszkodzonym prążkowie szczura w zależności od podania komórek zawieszonych w soli fizjologicznej lub skafoldach LP/FB.

A

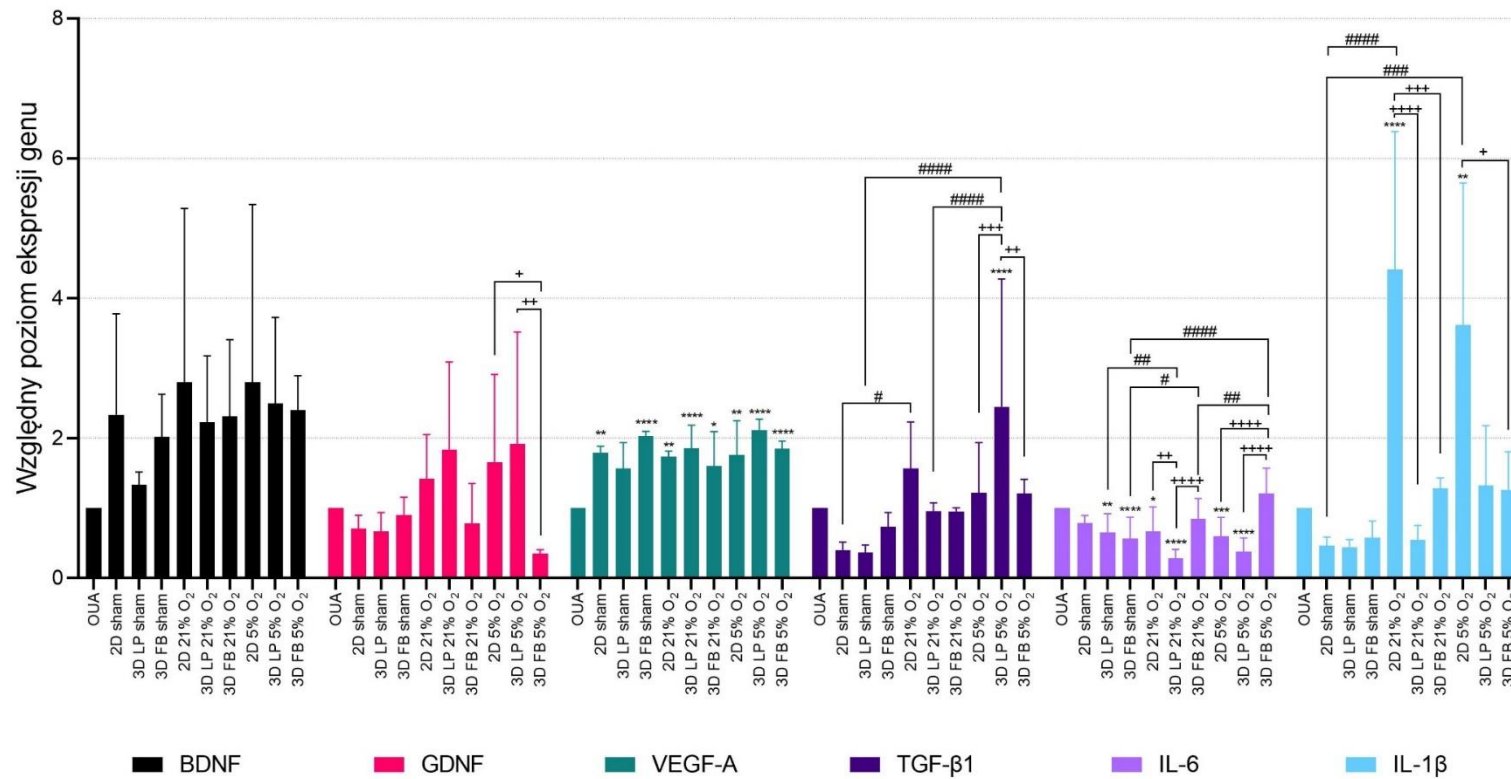
Ekspresja szczyrzych czynników troficzych i cytokin po 24h od przeszczepu

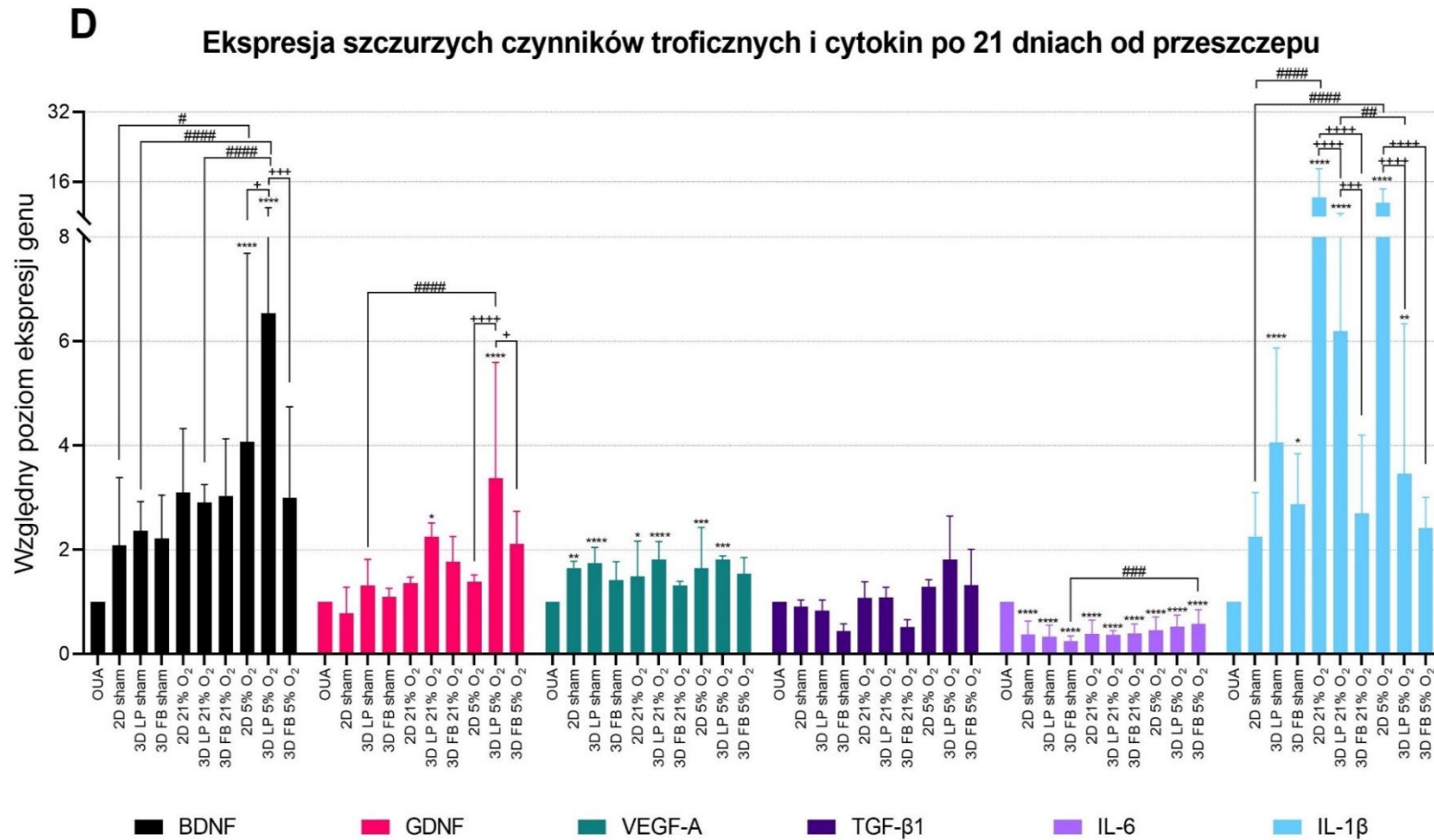




C

Ekspresja szczyrzych czynników troficznych i cytokin po 14 dniach od przeszczepu





Ryc.38. Analiza ekspresji szczyrzych czynników troficznych i cytokin na poziomie mRNA w uszkodzonym mózgu szczyra, po podaniu komórek WJ-MSC hodowanych w warunkach 21% O₂ lub 5% O₂, a następnie przeszczepionych w soli fizjologicznej (2D) lub hydrożelowych skafoldach (3D LP i 3D FB) oraz podaniu samej soli fizjologicznej/pustych skafoldów (sham) w różnych punktach czasowych (po 24 godz., 7, 14 i 21 dniach). Względny poziom ekspresji

analizowanych genów znormalizowano względem poziomu ekspresji genu referencyjnego GAPDH. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SD w odniesieniu do poziomu ekspresji obserwowanej w mózgach zwierząt po uszkodzeniu ogniskowym – OUA (wartość = 1, istotność statystyczna oznaczona „”). Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, a następnie testu wielokrotnych porównań Tukey’a ($n = 12$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; #### $p < 0,0001$; + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$; +++ $p < 0,001$; ++++ $p < 0,0001$), gdzie „#” oznacza porównanie poziomu ekspresji w uszkodzonym prążkowiu szczura w zależności od podania komórek WJ-MSC hodowanych w różnych warunkach tlenowych, zaś „+” oznacza porównanie poziomu ekspresji w uszkodzonym prążkowiu szczura w zależności od podania komórek zawieszonych w soli fizjologicznej lub skafoldach LP/FB.*

6.9.6. Analiza stężenia szczurzych cytokin i neurotrofin w płynie mózgowo-rdzeniowym w następstwie uszkodzenia mózgu oraz po transplantacji WJ-MSC

Analizowano poziom stężenia szczurzych markerów: BDNF, GDNF, VEGF-A, TGF- β 1, IL-6 oraz IL-1 β w różnych punktach czasowych (24 godz., 7, 14, 21 dni) od wywołania uszkodzenia mózgu oraz w następstwie podania komórek WJ-MSC w 2D oraz skafoldach LP lub FB. Komórki przed podaniem do uszkodzonego mózgu szczura były hodowane w warunkach 21% O₂ lub 5% O₂. Ocenę poziomu stężenia badanych cytokin przeprowadzono w płynie mózgowo-rdzeniowym pobranym z *cisterna magna* szczura.

Stężenie BDNF w płynie mózgowo-rdzeniowym szczura po uszkodzeniu ogniskowym (OUA) wyraźnie wzrosło w porównaniu do kontroli (36,80±10,85 pg/ml) (**Ryc.39 A**). Po 24 godz. od wywołania uszkodzenia mózgu poziom BDNF wynosił 150,13±92,46 pg/ml, po 7 dniach 82,80±76,37 pg/ml, po 14 dniach 48,80±21,17 pg/ml, natomiast po 21 dniach 48,80±22,63 pg/ml. Po podaniu soli fizjologicznej lub pustych skafoldów (sham), zaobserwowano zwiększone stężenie BDNF jedynie po 24 godz. W przypadku podania soli fizjologicznej, stężenie BDNF wynosiło 106,13±66,01 pg/ml, skafoldów LP – 218,80±121,62 pg/ml, zaś skafoldów FB – 182,80±234,76 pg/ml. W kolejnych dniach analizy stężenie BDNF utrzymywało się na podobnym poziomie jak w kontroli (około 40 pg/ml), zarówno po 7, 14 i 21 dniach od podania.

Po przeszczepie komórek WJ-MSC zaobserwowano znaczny wzrost stężenia BDNF po 24 godz., szczególnie w przypadku podania komórek w hydrożelach. Najwyższy poziom BDNF w płynie mózgowo-rdzeniowym odnotowano po przeszczepie WJ-MSC hodowanych w warunkach 21% O₂ i podanych w skafoldach LP (520,80±246,07 pg/ml) oraz komórek hodowanych w warunkach 5% O₂ i podanych w skafoldach FB (455,80±159,81 pg/ml). W pozostałych grupach badanych stężenie BDNF po 24 godz. od podania WJ-MSC odnotowano na poziomie 179,47±88,03 pg/ml (2D 21% O₂), 387,80±159,81 pg/ml (3D FB 21% O₂), 110,81±31,11 pg/ml (2D 5% O₂) oraz 292,80±50,91 pg/ml (3D LP 5% O₂). Po 7, 14 oraz 21 dniach od przeszczepu komórek WJ-MSC obserwowano wzrost stężenia BDNF w porównaniu do poziomu w płynie mózgowo-rdzeniowym szczurów po uszkodzeniu mózgu, którym nie zostały podane komórki. Ponadto, stężenie BDNF utrzymywało się na wyższym poziomie

po podaniu WJ-MSC w skafoldach, w szczególności po przeszczepie komórek w skafoldach FB w porównaniu do 2D (**Ryc.39 A**).

Stężenie GDNF w płynie mózgowo-rdzeniowym szczura po uszkodzeniu ogniskowym zaobserwowano na niższym poziomie niż w kontroli ($190 \pm 114,90$ pg/ml) (**Ryc.39 B**). Po 24 godz. od wywołania uszkodzenia mózgu poziom GDNF wynosił $158,75 \pm 212,13$ pg/ml, po 7 dniach $83,75$ pg/ml, po 14 dniach $171,25 \pm 229,81$ pg/ml, natomiast po 21 dniach $71,25 \pm 53,03$ pg/ml. Podanie soli fizjologicznej lub pustych skafoldów skutkowało zwiększeniem stężenia GDNF jedynie w przypadku skafoldów LP po 24 godz. od przeszczepu ($229,58 \pm 191,35$ pg/ml). Po podaniu soli fizjologicznej oraz pustych skafoldów FB obserwowano podobne lub zmniejszone stężenie GDNF w kolejnych punktach czasowych w porównaniu do grup po uszkodzeniu ogniskowym (OUA).

Po przeszczepie komórek WJ-MSC zaobserwowano wyraźny wzrost stężenia GDNF po 24 godz., szczególnie w przypadku podania komórek w skafoldach. Najwyższy poziom GDNF w płynie mózgowo-rdzeniowym odnotowano po przeszczepie WJ-MSC w rusztowaniach LP, hodowanych przed podaniem w warunkach 21% O₂ ($546,25 \pm 249,69$ pg/ml) oraz w warunkach 5% O₂ ($402,50 \pm 26,52$ pg/ml). Po 7 dniach od przeszczepu komórek WJ-MSC również obserwowano wzrost stężenia GDNF w porównaniu do poziomu w płynie mózgowo-rdzeniowym szczurów po uszkodzeniu mózgu, którym nie zostały podane komórki. Po 14 dniach zwiększone stężenie GDNF zaobserwowano po podaniu komórek hodowanych w warunkach 21% O₂ i przeszczepionych w skafoldach FB ($346,25 \pm 53,03$ pg/ml) oraz WJ-MSC z 5% O₂ podanych w soli fizjologicznej ($308,75 \pm 106,07$ pg/ml). Po 21 dniach od podania komórek stężenie GDNF obserwowano na podobnym lub zmniejszonym poziomie w porównaniu do grup po uszkodzeniu ogniskowym. W przypadku niektórych próbek stężenie GDNF w analizowanym płynie mózgowo-rdzeniowym było poniżej poziomu detekcji (**Ryc.39 B**).

Stężenie VEGF-A w płynie mózgowo-rdzeniowym szczura po uszkodzeniu ogniskowym odnotowano na porównywalnym poziomie jak w kontroli ($78,10 \pm 4,38$ pg/ml) (**Ryc.39 C**). Po 24 godz. od wywołania uszkodzenia mózgu poziom VEGF-A wynosił $83,53$ pg/ml, po 7 dniach $73,56 \pm 4,67$ pg/ml, po 14 dniach $85,28 \pm 10,86$ pg/ml, natomiast po 21 dniach $71,97 \pm 3,43$ pg/ml. Po podaniu soli fizjologicznej lub pustych skafoldów (sham), zaobserwowano niższe stężenie

VEGF-A głównie po 24 godz. W przypadku podania soli fizjologicznej, stężenie VEGF-A wynosiło $68,57 \pm 4,12$ pg/ml, skafoldów LP – $60,95 \pm 8,34$ pg/ml, zaś skafoldów FB – $69,55 \pm 8,09$ pg/ml. W kolejnych dniach analizy stężenie VEGF-A utrzymywało się na podobnym poziomie jak w kontroli (około 75 pg/ml), zarówno po 7, 14 i 21 dniach od podania soli fizjologicznej lub skafoldów LP. Natomiast w przypadku podania skafoldów FB stężenie VEGF-A utrzymywało się na niższym poziomie niż zaobserwowano w kontroli – około 65 pg/ml po 7, 14 oraz 21 dniach od podania.

Po podaniu WJ-MSC najwyższy poziom VEGF-A w płynie mózgowo-rdzeniowym odnotowano po 14 dniach od przeszczepu komórek hodowanych w warunkach 21% O₂ i podanych w skafoldach LP ($87,15 \pm 9,65$ pg/ml) oraz komórek hodowanych w warunkach 5% O₂ i podanych w skafoldach FB ($87,40 \pm 22,32$ pg/ml). Po 24 godz. od podania komórek stężenie VEGF-A obserwowano na podobnym poziomie, około 80 pg/ml zarówno po podaniu WJ-MSC w 2D oraz skafoldach. Jedynie w przypadku podania komórek hodowanych w warunkach 21% O₂ i przeszczepionych w skafoldach FB stężenie VEGF-A wynosiło $67,37 \pm 3,04$ pg/ml. Po 7 dniach od podania WJ-MSC najwyższe stężenie obserwowano po podaniu komórek hodowanych w 21% O₂ i przeszczepionych w soli fizjologicznej oraz skafoldach LP (około 84 pg/ml), natomiast najniższe po podaniu WJ-MSC hodowanych w 5% O₂ i przeszczepionych w soli fizjologicznej i skafoldach FB (około 69 pg/ml). Po 21 dniach od podania komórek stężenie VEGF-A utrzymywało się na podobnym poziomie, około 74 pg/ml we wszystkich grupach eksperymentalnych. Najwyższe stężenie zaobserwowano w grupie 2D 21% O₂ – $81,25 \pm 9,08$ pg/ml (**Ryc.39 C**).

Stężenie TGF-β1 w płynie mózgowo-rdzeniowym szczura po uszkodzeniu ogniskowym zaobserwowano na wyższym poziomie niż w kontroli ($442,22 \pm 284,30$ pg/ml) (**Ryc.39 D**). Po 24 godz. od wywołania uszkodzenia mózgu stężenie TGF-β1 wynosiło $666,87 \pm 191,81$ pg/ml, po 7 dniach $977,91 \pm 284,33$ pg/ml, po 14 dniach $1079,26 \pm 429,90$ pg/ml, natomiast po 21 dniach $921,14 \pm 435,19$ pg/ml. Podanie soli fizjologicznej lub pustych skafoldów skutkowało zwiększeniem stężenia TGF-β1 jedynie w przypadku skafoldów FB po 24 godz. od przeszczepu ($907,77 \pm 860,08$ pg/ml) oraz 7 dniach od przeszczepu ($989,29 \pm 780,66$ pg/ml) w porównaniu do grup po uszkodzeniu ogniskowym. W pozostałych grupach sham obserwowano zmniejszone stężenie TGF-β1 w kolejnych punktach czasowych

w porównaniu do OUA, szczególnie 21 dni po podaniu skafoldów LP (295,31±152,18).

Po przeszczepie komórek WJ-MSC zaobserwowano wzrost stężenia TGF-β1 po 24 godz., szczególnie w przypadku podania komórek w skafoldach. Najwyższy poziom TGF-β1 w płynie mózgowo-rdzeniowym odnotowano po przeszczepie WJ-MSC w rusztowaniach LP, hodowanych przed podaniem w warunkach 21% O₂ (1686,74±277,92 pg/ml) oraz rusztowaniach FB hodowanych przed podaniem w warunkach 5% O₂ (1583,75±1319,95 pg/ml). Po 7 dniach od przeszczepu komórek WJ-MSC również odnotowano wzrost stężenia TGF-β1 w porównaniu do stężenia obserwowanego w płynie mózgowo-rdzeniowym szczurów po uszkodzeniu mózgu, którym nie zostały podane komórki. Najwyższe stężenie TGF-β1 odnotowano po podaniu komórek hodowanych w 5% O₂ i przeszczepionych w skafoldach LP (1293,09±605,23 pg/ml) oraz skafoldach FB (1299,40±420,73 pg/ml). Po 14 dniach najwyższe stężenie TGF-β1 zaobserwowano po podaniu komórek hodowanych w warunkach 5% O₂ i przeszczepionych w skafoldach LP (1771,86±759,82 pg/ml). Po 21 dniach od podania komórek najwyższe stężenie TGF-β1 odnotowano po podaniu komórek WJ-MSC hodowanych w warunkach 5% O₂ i przeszczepionych w skafoldach FB (1272,27±451,47 pg/ml) oraz komórek hodowanych w warunkach 21% O₂ i przeszczepionych w skafoldach LP (1230,67±916,88 pg/ml) (**Ryc.39 D**).

Stężenie IL-6 w płynie mózgowo-rdzeniowym szczura po uszkodzeniu ogniskowym nieznacznie wzrosło po 24 godz. (954,59±65,15 pg/ml) oraz po 7 dniach (968,28±20,55 pg/ml) od wywołania uszkodzenia mózgu w porównaniu do kontroli (904,61±130,28 pg/ml) (**Ryc.39 E**). Po podaniu soli fizjologicznej lub pustych skafoldów (sham), zaobserwowano zmniejszone stężenie IL-6 w porównaniu do stężenia obserwowanego w płynie mózgowo-rdzeniowym po OUA. Najniższe stężenie odnotowano 7 dni po podaniu skafoldów LP (803,08±51,91 pg/ml), zaś najwyższe – 7 dni po podaniu soli fizjologicznej (922,16±39,57pg/ml).

Po przeszczepie komórek WJ-MSC zaobserwowano spadek stężenia IL-6 po 24 godz. szczególnie w przypadku podania komórek w hydrożelach. Najniższy poziom IL-6 w płynie mózgowo-rdzeniowym odnotowano po przeszczepie WJ-MSC hodowanych w warunkach 5% O₂ i podanych w skafoldach LP (828,71±48,33 pg/ml) oraz podanych w skafoldach FB (816,20±59,19 pg/ml). Po

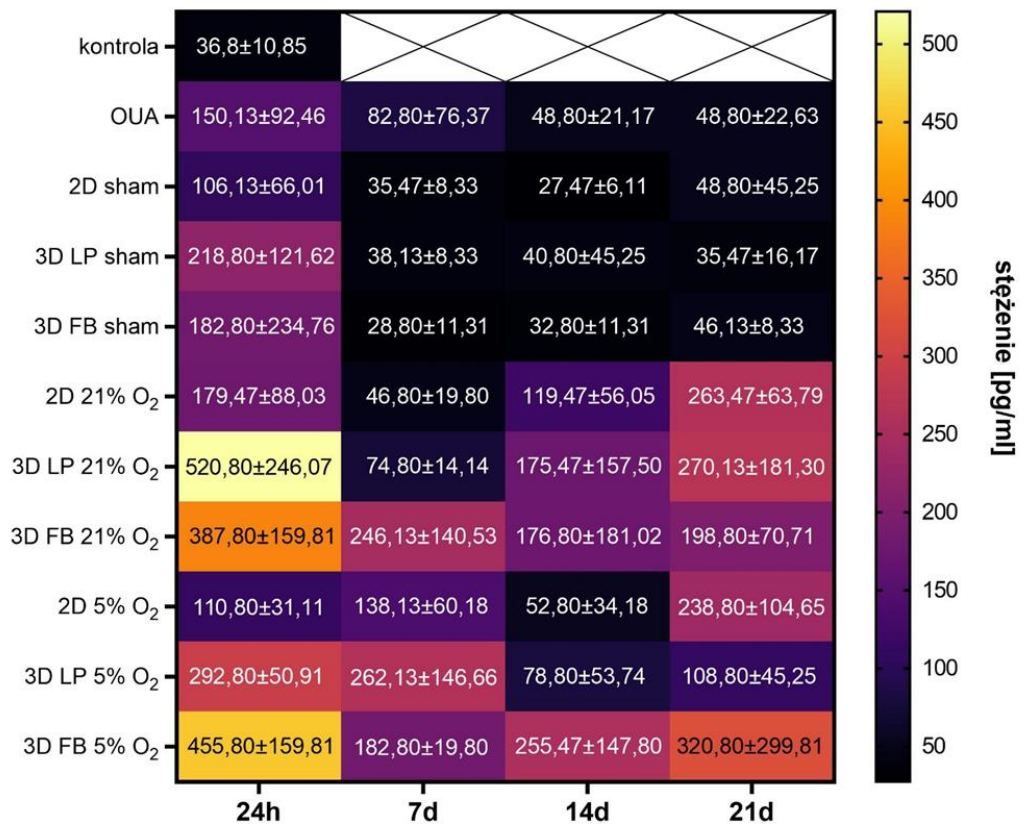
7 dniach od przeszczepu najniższe stężenie IL-6 zaobserwowano po podaniu WJ-MSC hodowanych w 5% O₂ i przeszczepionych w skafoldach FB (785,35±109,63 pg/ml), zaś najwyższe po podaniu w soli fizjologicznej komórek hodowanych w 21% O₂ (906,76±68,46 pg/ml). Po 14 oraz 21 dniach od przeszczepu komórek WJ-MSC obserwowano zmniejszone stężenie IL-6 po podaniu komórek w skafoldach w porównaniu do 2D, szczególnie hodowanych w warunkach fizjologicznej normoksji (**Ryc.39 E**).

Stężenie IL-1β w płynie mózgowo-rdzeniowym szczura po uszkodzeniu ogniskowym zaobserwowano na wyższym poziomie niż w kontroli (12,15±0,94 pg/ml) (**Ryc.39 F**). Po 24 godz. od wywołania uszkodzenia mózgu poziom IL-1β wynosił 15,09±2,38 pg/ml, po 7 dniach 17,20±0,85 pg/ml, po 14 dniach 12,83±2,02 pg/ml, natomiast po 21 dniach 13,63±1,27 pg/ml. Podanie soli fizjologicznej lub pustych skafoldów skutkowało zmniejszeniem stężenia IL-1β w porównaniu do grup po uszkodzeniu ogniskowym. Jedynie w przypadku skafoldów FB po 24 godz. od przeszczepu zaobserwowano wyższe stężenie IL-1β (15,71±2,49 pg/ml).

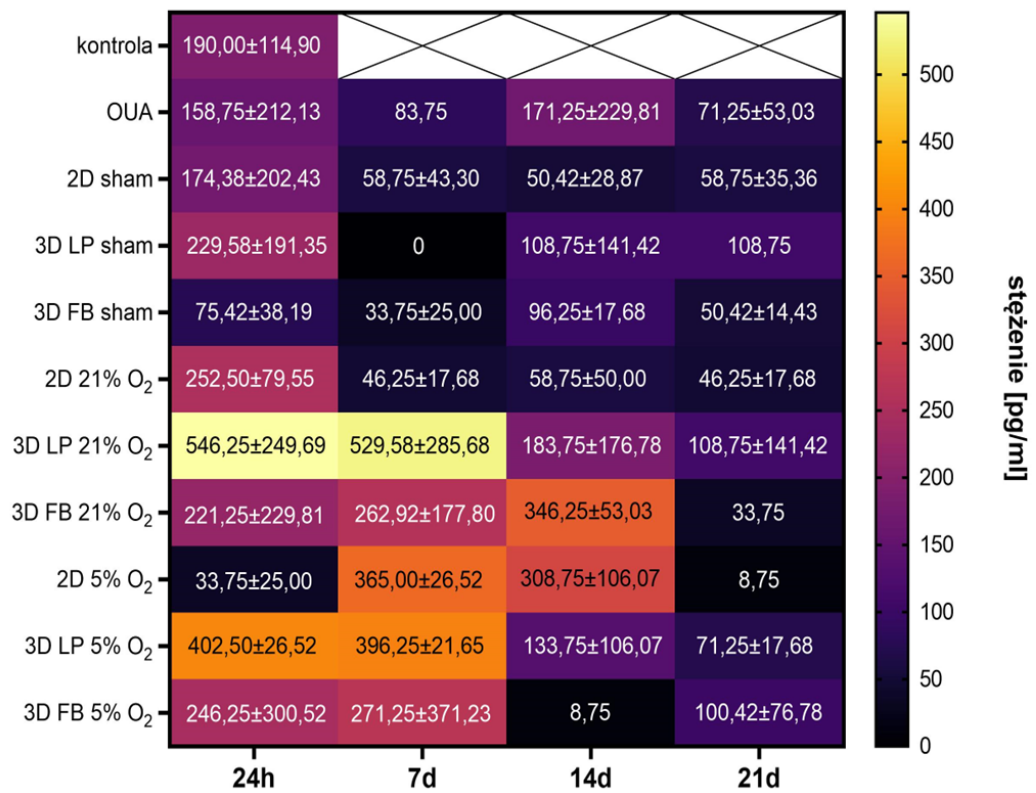
Po przeszczepie komórek WJ-MSC zaobserwowano spadek stężenia IL-1β po 24 godz., szczególnie w przypadku podania komórek w skafoldach. Najniższy poziom IL-1β w płynie mózgowo-rdzeniowym odnotowano po przeszczepie WJ-MSC w rusztowaniach FB, hodowanych przed podaniem w warunkach 5% O₂ (10,75±1,79 pg/ml) oraz 21% O₂ (11,47±2,37 pg/ml). Po 7, 14 oraz 21 dniach od przeszczepu komórek WJ-MSC również obserwowano spadek stężenia IL-1β w porównaniu do poziomu odnotowanego w płynie mózgowo-rdzeniowym szczurów po uszkodzeniu mózgu, którym nie zostały podane komórki (**Ryc.39 F**).

A

BDNF



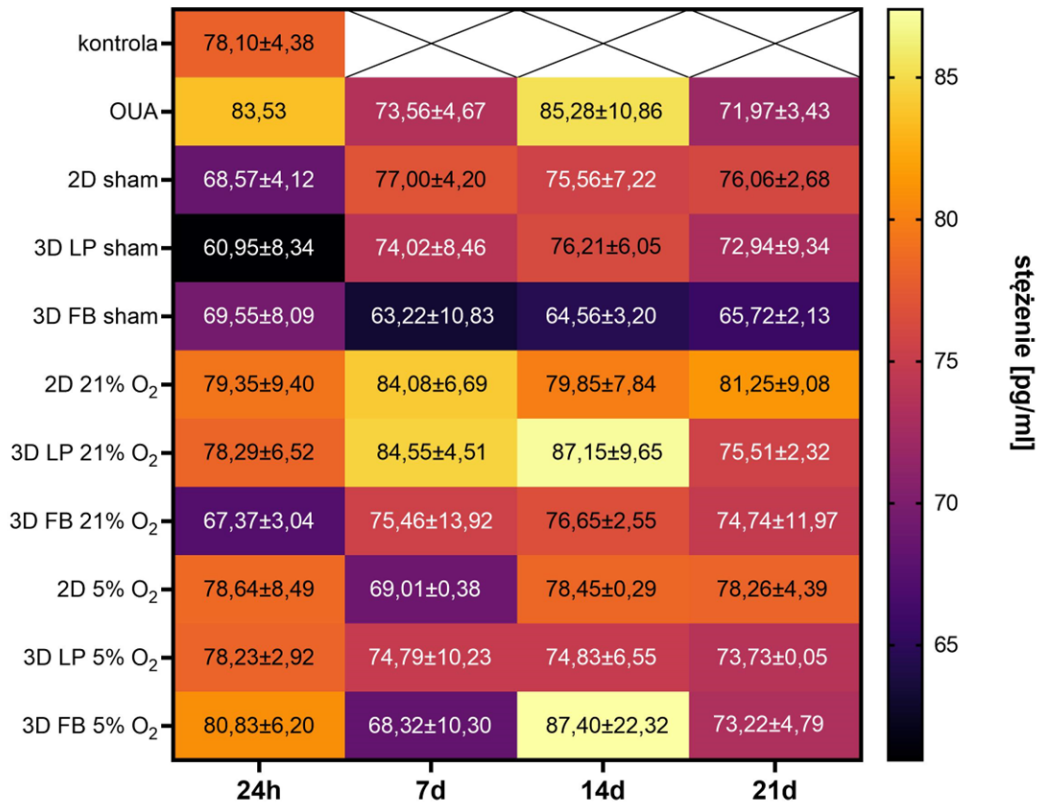
kontrola vs 3D LP 21% O ₂ 24h	kontrola vs 3D FB 21% O ₂ 24h	kontrola vs 3D FB 5% O ₂ 24h	OUA 24h vs 3D LP 21% O ₂ 24h
***	*	**	*
2D sham 24h vs 3D LP 21% O ₂ 24h	2D sham 24h vs 3D FB 5% O ₂ 24h	2D 21% O ₂ 24h vs 3D LP 21% O ₂ 24h	3D LP 21% O ₂ 24h vs 2D 5% O ₂ 24h
**	*	*	*

B**GDNF**

2D sham 24h vs 3D LP 21% O ₂ 24h	2D sham 24h vs 3D LP 21% O ₂ 24h	3D LP 21% O ₂ 24h vs 2D 5% O ₂ 24h
*	*	**
2D sham 7d vs 3D LP 21% O ₂ 7d	2D sham 7d vs 3D LP 21% O ₂ 7d	2D 21% O ₂ 7d vs 3D LP 21% O ₂ 7d
**	**	*

C

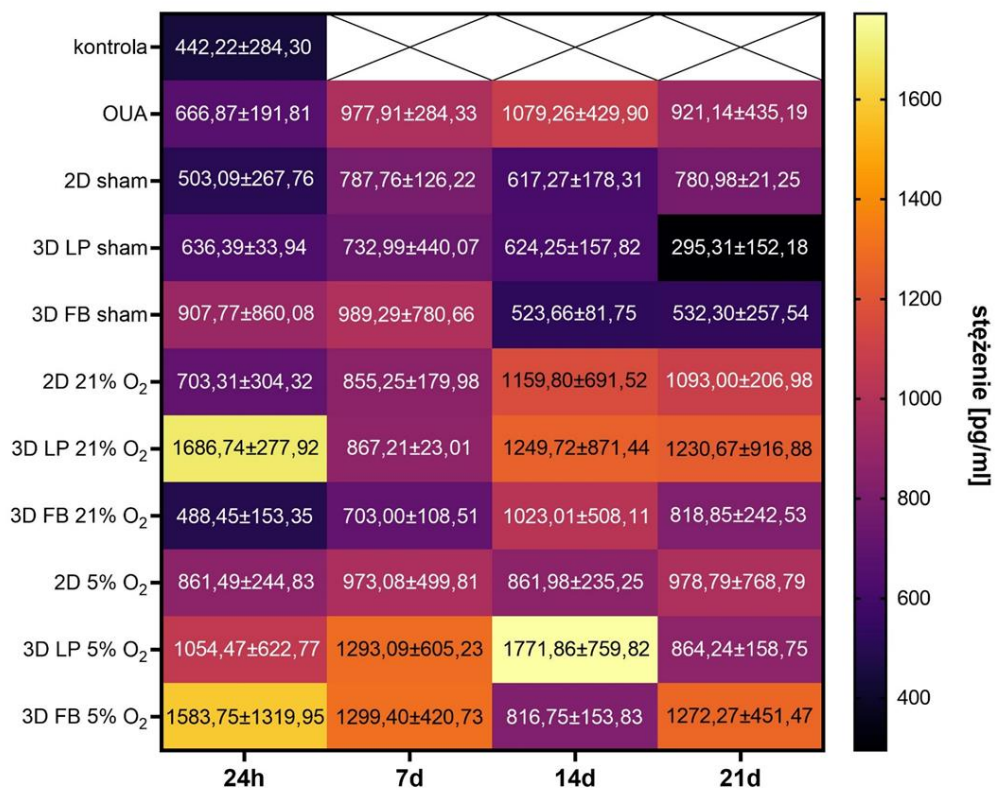
VEGF-A



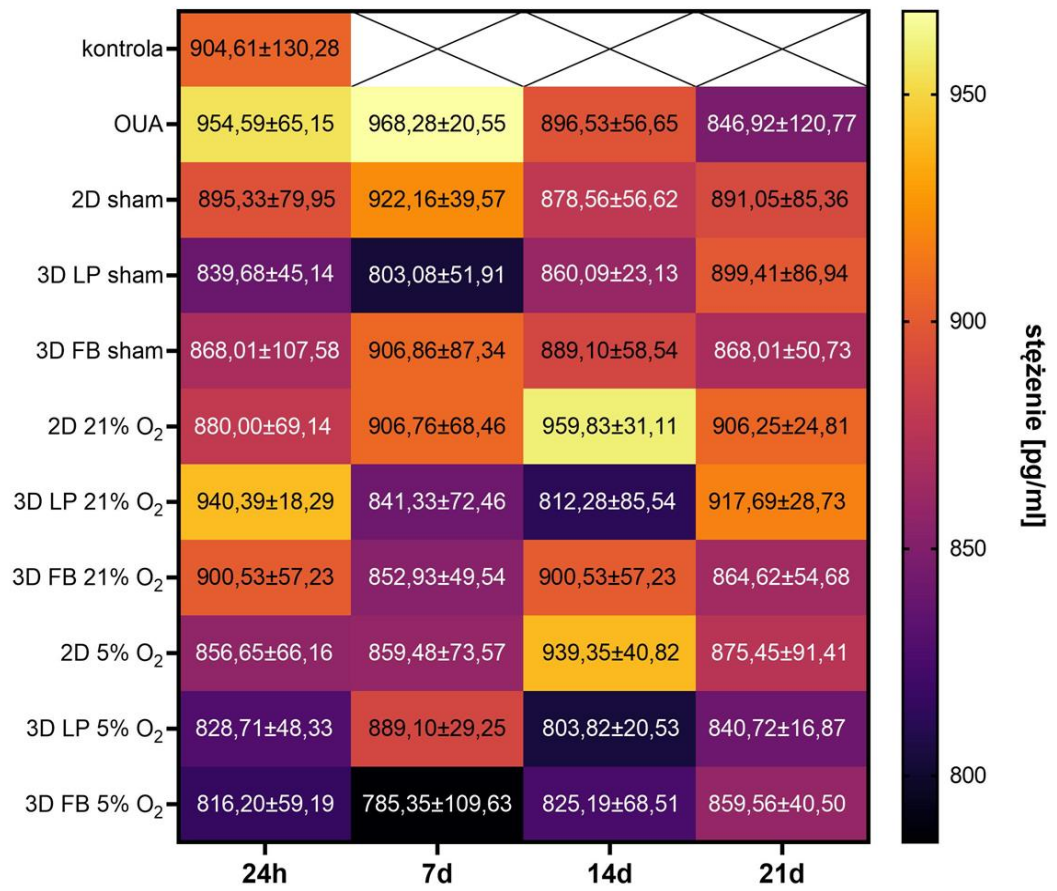
OUA 24h vs 3D LP sham 24h	3D LP sham 24h vs 2D 21% O ₂ 24h	3D LP sham 24h vs 3D FB 5% O ₂ 24h	3D FB sham 7d vs 2D 21% O ₂ 7d
*	*	**	*
3D FB sham 7d vs 3D LP 21% O ₂ 7d	OUA 14d vs 3D FB sham 7d	3D FB sham 14d vs 3D LP 21% O ₂ 14d	3D FB sham 14d vs 3D FB 5% O ₂ 14d
**	**	***	*

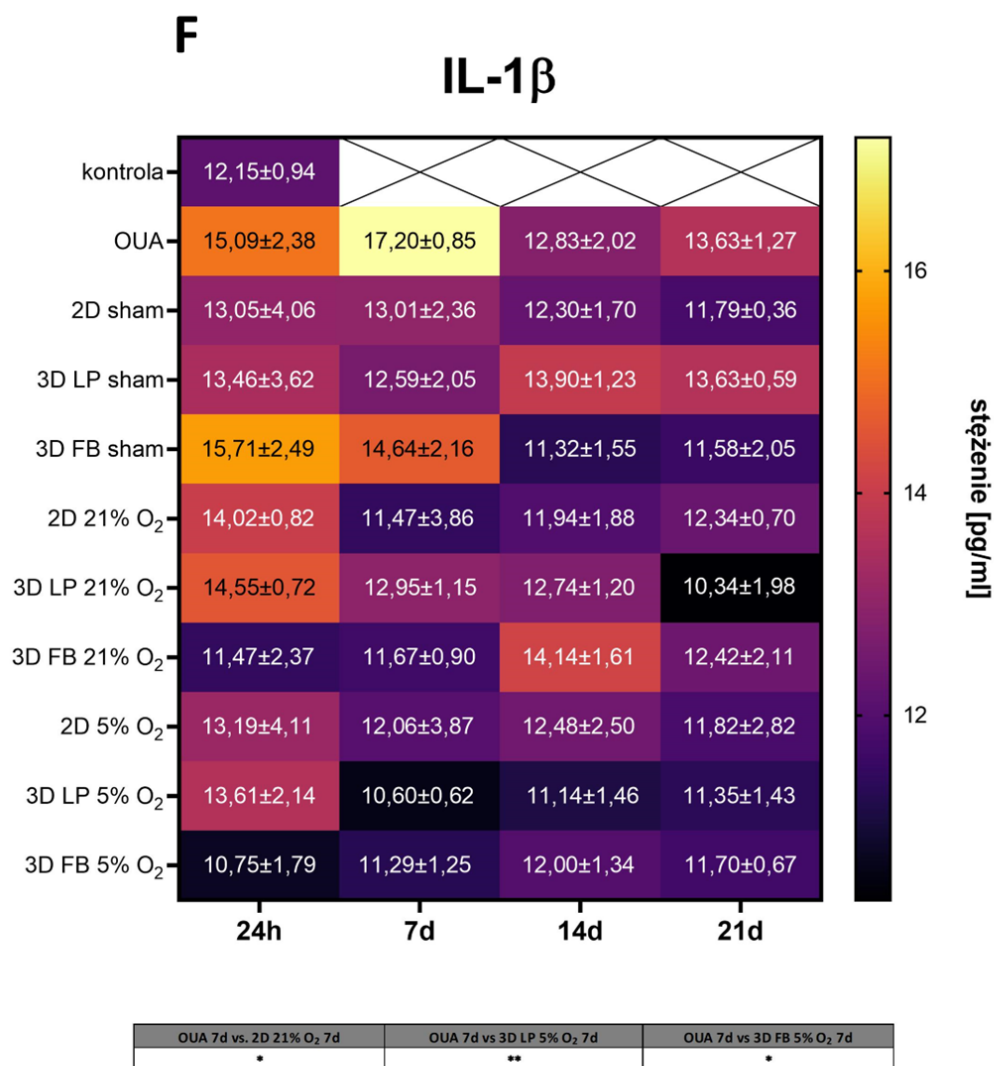
D

TGF-β1



kontrola vs 3D LP 5% O ₂ 14d	2D sham 14d vs 3D LP 5% O ₂ 14d	3D FB sham 14d vs 3D LP 5% O ₂ 14d
*	*	*

E**IL-6**



Ryc.39. Analiza poziomu stężenia neurotrofin i cytokin pro- i przeciwzapalnych w płynie mózgowo-rdzeniowym szczura po uszkodzeniu ogniskowym, podaniu komórek WJ-MSC hodowanych w warunkach 21% O₂ lub 5% O₂, a następnie przeszczepionych w soli fizjologicznej (2D) lub hydrożelowych skafoldach (3D LP i 3D FB) oraz podaniu samej soli fizjologicznej/pustych skafoldów (sham) w różnych punktach czasowych (po 24 godz., 7, 14 i 21 dniach). Wyniki przedstawiono jako średnie ± SD. Analizę statystyczną przeprowadzono przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA, a następnie testu wielokrotnych porównań Tukey'a (n = 4; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

7. Dyskusja

W niniejszej pracy weryfikowano hipotezę badawczą zakładającą, że potencjał terapeutyczny WJ-MSC zależy od warunków mikrośrodowiska *in vitro*, w którym komórki były prekondycjonowane, a zastosowanie warunków biomimetycznych dla tkanki nerwowej OUN (struktura skafoldów hydrożelowych 3D oraz obniżenie poziomu tlenu do „fizjologicznej normoksji” 5% O₂) ma pozytywny wpływ na ten potencjał. Wyznaczniakiem wzrostu (lub spadku) potencjału terapeutycznego WJ-MSC w różnych warunkach mikrośrodowiska były: 1) w badaniach *in vitro*: żywotność; proliferacja; zdolność do migracji; zdolność do różnicowania w kierunku neuralnym; ekspresja czynników troficznych i cytokin prozapalnych; zmiany w profilu ekspresji wybranych genów w odpowiedzi na stymulację czynnikami prozapalnymi; 2) w badaniach *ex vivo*: neuroprotekcja uszkodzonych w wyniku OGD skrawków hipokampa szczura; zmiany w ekspresji badanych markerów (wyznaczyków różnicowania i zdolności parakrynych) po współhodowli z uszkodzoną tkanką nerwową; 3) w badaniach *in vivo*: potwierdzenie obecności i przeżycia przeszczepionych komórek oraz ekspresja czynników troficznych i cytokin biorcy badana w tkance i w płynie mózgowo-rdzeniowym.

Wyniki badań *in vitro*, *ex vivo* oraz *in vivo*, zaprezentowane w niniejszej pracy, zweryfikowały pozytywnie hipotezę badawczą i wykazały, że potencjał terapeutyczny WJ-MSC zależy od warunków mikrośrodowiska, w którym komórki są prekondycjonowane, przy czym istotnie pozytywny wpływ na ten potencjał miało zastosowanie skafoldów w postaci hydrożeli oraz warunków fizjologicznej normoksji (5% O₂). Na uwagę zwraca również fakt zmiany odpowiedzi komórek pod wpływem obecności w środowisku mediatorów stanu zapalnego.

7.1. Zastosowanie warunków biomimetycznych w hodowli *in vitro* istotnie wpływa na właściwości komórek macierzystych

Wcześniejsze badania prowadzone w naszym Zespole wykazały, że kondycja WJ-MSC, tj. ich zdolność do przeżycia i aktywność proliferacyjna oraz wydzielnicza są zależne od sposobu ich izolacji i metoda mechaniczna pozyskiwania komórek, w porównaniu z enzymatyczną, jest bardziej skuteczna (Lech i wsp., 2016). Dlatego w ramach niniejszej rozprawy WJ-MSC otrzymywano

stosując standardową metodę mechanicznej fragmentacji tkanki oraz wycinania skrawków przy użyciu narzędzia do biopsji. Pierwsze komórki o kształcie zbliżonym do fibroblastów pojawiały się po około 7 dniach hodowli pierwotnej. Jest to zbieżne z naszymi wcześniejszymi obserwacjami dotyczącymi izolacji i hodowli komórek WJ-MSC (Lech i wsp., 2016; Drela i wsp., 2016; Obtulowicz i wsp., 2016). Wydatne różnicowanie w linii mezodermalnej oraz wysoka ekspresja markerów powierzchniowych (CD73, CD90) potwierdziły mezenchymalny fenotyp pozyskanych populacji komórek WJ-MSC, zatem wszystkie kryteria stawiane przez ISCT (Dominici i wsp., 2006) zostały spełnione (**Ryc.18-19**).

7.1.1. Hydrożelowe skafoldy

Rodzaj i sposób przygotowania trójwymiarowych nośników/konstruktywów z komórkami jest determinowany przez metodę ich późniejszego podania oraz właściwości fizykochemiczne docelowej tkanki, do której zostanie przeszczepiony (Pina i wsp., 2019). Dlatego w niniejszych badaniach zastosowano nośniki, których właściwości fizykochemiczne są zbliżone do tkanki nerwowej występującej w mózgu: wykonane z białek ludzkiego osocza – skafoldy z lizatu płytkowego (LP) oraz fibrynogenu (FB).

Skafoldy LP zostały wykonane z roztworu ludzkiego lizatu płytkowego, który zawiera mniej fibrynogenu niż rusztowania fibrynowe. Według wskazań producenta, stężenie fibrynogenu w lizacie płytkowym wynosi 0,43 mg/ml (Viau i wsp., 2016), natomiast w rusztowaniach fibrynowych stężenie fibrynogenu wynosiło 5 mg/ml. Z tego względu, zostały zaobserwowane wyraźne różnice w strukturze obu badanych skafoldów. Po dodaniu roztworu trombiny oraz chlorku wapnia, utworzone w ten sposób włókna fibryny w skafoldach LP były cieńsze, struktura samego skafoldu bardziej delikatna niż skafoldów FB i podatna na przebudowę przez komórki (**Ryc.20**). Ponadto, skafoldy FB wykonane zostały z 5 mg/ml fibrynogenu i 2 U/ml trombiny, co według danych literaturowych, daje im elastyczność zbliżoną do obserwowanej w mózgu, czyli poniżej 1 kPa (Duong i wsp., 2009). Komórki WJ-MSC pierwotnie immobilizowane do wewnętrznej struktury rusztowania były ostatecznie uwalniane w procesie przebudowy skafoldu wywołanym degradacją włókien fibryny (**Ryc.21**). Zdolność komórek do przebudowy struktury stosowanych biomateriałów jest istotnym czynnikiem wpływającym na możliwości migracji komórek z rusztowania (nośnika) do

uszkodzonej tkanki. Ta sama zdolność do przebudowy wpływa również na skuteczność różnicowania neuronalnego komórek (Madl i wsp., 2019).

Podczas trwającej 7 dni hodowli komórek WJ-MSC w skafoldach hydrożelowych wykonanych z lizatu płytkowego lub fibrynogenu zaobserwowano wysoką żywotność komórek i ich rozprzestrzenianie się w trójwymiarowej strukturze hydrożelu (**Ryc.23**). Analiza przyżyciowego obrazowania wykazała ponadto, że WJ-MSC podczas przebudowy struktury rusztowania lizatowego migrowały poza hydrożel. Dodatkowo, w przypadku skafoldów LP zauważono, że wymiary rusztowania zaczęły się wyraźnie zmniejszać już po 48 godz. hodowli *in vitro* mimo zastosowania inhibitora degradacji fibrynogenu – aprotyniny. Najbardziej prawdopodobną przyczyną jest degradacja ich delikatnej struktury, częściowe rozpuszczanie składników skafoldu w pożywce oraz naprężenia generowane przez komórki MSC. Redukcja rozmiarów rusztowania była znacznie mniej zauważalna w przypadku skafoldów FB ze względu na wyższe stężenie usieciowanego fibrynogenu (Ventre i wsp., 2016) i większy opór, który hydrożel stawia komórkom.

Ponadto zaobserwowano, że w komórkach WJ-MSC hodowanych w obu typach hydrożelowych rusztowań wyraźnie wzrosła ekspresja markerów związanych z różnicowaniem neuralnym i glejowym – nestyny, β -Tubuliny III, NF-200 i GFAP na poziomie mRNA oraz białka (**Ryc.24-25**) w porównaniu do hodowli 2D. Sugeruje to, że skafoldy wykonane z białek ludzkiego osocza zapewniają odpowiednie środowisko dla hodowli komórek mezenchymalnych indukując równocześnie różnicowanie neuralne komórek WJ-MSC. W badaniach Hosseini i wsp. (2015) wykazano, że w przypadku komórek hodowanych w skafoldach wykonanych z alginianu ekspresja β -Tubuliny i *CD271* (receptora czynnika wzrostu nerwów o niskim powinowactwie, *LNGFR*, ang. *Low-affinity Nerve Growth Factor Receptor*) znacząco wzrosła w porównaniu do WJ-MSC hodowanych w 2D (Hosseini i wsp., 2015). Z kolei WJ-MSC hodowane na skafoldach z elektroprzędzonych włókien polikaprolaktonowych pokrywanych kolagenem wykazywały potencjał do różnicowania w motoneurony – znacząco wzrosła ekspresja nestyny, neurofilamentu H (NF-H, ang. *Neurofilament-H*), acetylotransferazy cholinowej (ChAT, ang. *Choline Acetyltransferase*) oraz czynnika Islet-1 (ang. *LIM homeodomain transcription factor*) na poziomie mRNA i białka (Bagher i wsp., 2016).

Na kierunek różnicowania komórek może mieć wpływ również sztywność podłoża (Engler i wsp., 2006), która w standardowych warunkach *in vitro* jest bardzo niefizjologiczna, gdyż dla polistyrenu, z którego są wykonane plastikowe naczynia do hodowli komórkowych wynosi około 10^5 – 10^6 kPa (Skardal i wsp., 2013), a elastyczność zastosowanego skafoldu fibrynowego, jak już wcześniej wspomniano, jest zbliżona do obserwowanej w tkance nerwowej. Dlatego ten czynnik może mieć istotne znaczenie dla zdolności do różnicowania badanych komórek i powinien być brany pod uwagę w projektowaniu biomateriałów stosowanych w inżynierii tkankowej.

Przegląd dostępnej literatury dodatkowo potwierdza ideę wykorzystania lizatu płytkowego jako czynnika adiuwantowego do hodowli komórkowych w badaniach klinicznych. W eksperymentalnym modelu niedokrwienia kończyn *in vitro* i *in vivo* stwierdzono, że hydrożelowe skafoldy wykonane z lizatu płytkowego stymulują aktywność proangiogenną poprzez promowanie wzrostu i migracji ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych (Robinson i wsp., 2017). Inne badania wykazały z kolei, że ludzki lizat płytkowy nie poprawia przeżywalności komórek w rusztowaniach hydrożelowych dłużej niż 2 tygodnie po przeszczepie (Allen i wsp., 2017). Zaobserwowany efekt może być zależny od zastosowanej dawki, jak pokazano w eksperymencie z komórkami MSC pochodzącymi z miazgi zębowej. W tym przypadku odpowiednie stężenie lizatu płytkowego wzmagało proliferację komórek macierzystych miazgi zębowej *in vitro* i wywoływało istotnie pozytywny efekt regeneracyjny *in vivo* (Chen i wsp., 2012). Badania wskazują, że zaobserwowana regeneracja kości czy chrząstki po zastosowaniu komórek mezenchymalnych w połączeniu z odpowiednimi biomateriałami zachodzi w wyniku zastąpienia uszkodzonych tkanek (Bianco i wsp., 2013; Li i wsp., 2019; Kosiński i wsp., 2020). W przypadku schorzeń neurologicznych taka regeneracja jest wyjątkowo dyskusyjna, jednak zaobserwowano potencjał terapeutyczny komórek MSC podanych w hydrożelu oparty na ich właściwościach parakrynych (wydzielniczych), takich jak wytwarzanie czynników immunomodulujących czy neurogennych (Martín-Martín i wsp., 2019).

7.1.2. Fizjologiczna normoksja

Odwzorowanie warunków występujących w endogennej niszy komórek macierzystych w hodowli *in vitro*, poza mikrośrodowiskiem 3D, dotyczy również

„fizjologicznej normoksji”, czyli stężenia tlenu występującego w tkance endogennej.

Wiele badań dotyczących komórek macierzystych wskazuje poziom stężenia tlenu w niszy neuralnych komórek macierzystych w zakresie od 1 do 8% (Mohyeldin i wsp., 2010; Huang, i wsp., 2017), stąd w niniejszej pracy ustalono warunki fizjologicznej normoksji *in vitro* dla komórek WJ-MSC na poziomie 5% O₂. Prace związane z dostosowaniem stężenia tlenu w hodowli *in vitro* komórek macierzystych do poziomu fizjologicznej normoksji prowadzono od lat w Zakładzie Bioinżynierii Komórek Macierzystych i dotyczyły komórek różnego pochodzenia: izolowanych z galarety Whartona, jak i szpiku kostnego, tkanki tłuszczowej czy krwi pępowinowej (Szabłowska-Gadomska i wsp., 2012, Drela i wsp., 2014; Drela i wsp., 2016; Lech i wsp., 2016; Obtulowicz i wsp., 2016). Ze względu na wahania stężenia tlenu, na jakie są narażone komórki podczas rutynowych czynności przy wymianie pożywki czy pasażu, zdecydowano się na prowadzenie hodowli w warunkach 5% O₂ w specjalnej komorze do hipoksji/normoksji, zapewniającej stałe warunki stężenia tlenu, dwutlenku węgla oraz temperatury podczas wszelkich manipulacji z komórkami.

Wcześniejsze badania naszego Zespołu wykazały, że obniżony poziom stężenia tlenu podczas hodowli (5% O₂) jest optymalny dla wzrostu komórek oraz nie powoduje niekorzystnych zmian kariotypowych. W przeciwieństwie do tego, długotrwała hodowla w warunkach tlenu atmosferycznego (21% O₂), wywołała niestabilność genetyczną i przyczyniła się do powstania poliploidii (Lech i wsp., 2016). Prowadzenie hodowli w warunkach obniżonego stężenia tlenu ma ponadto pozytywny wpływ na przebieg procesów komórkowych: stymuluje potencjał proliferacyjny mezenchymalnych komórek macierzystych i hamuje procesy starzenia podczas hodowli *in vitro* (Drela i wsp., 2014; Lech i wsp., 2016). W innych badaniach, w hodowli MSC pochodzących ze szpiku kostnego utrzymywanych w warunkach tlenu atmosferycznego (21% O₂) odnotowano zahamowanie wzrostu i różnicowania komórek (Boregowda i wsp., 2012).

W niniejszej rozprawie oraz przeprowadzonych ostatnio badaniach porównawczych różnych linii mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych z galarety Whartona hodowanych w warunkach 21% i 5% O₂ (Tomecka, Lech i wsp., 2021) wykazano, iż warunki fizjologicznej normoksji miały korzystny wpływ na zwiększenie tempa proliferacji, potencjału klonogenego,

a także spowolnienie procesu starzenia WJ-MSC. Potencjał do różnicowania w kierunku adipocytów, osteocytów i chondrocytów był porównywalny w obu warunkach tlenowych, natomiast spontaniczne różnicowanie WJ-MSC w kierunku neuralnym było istotnie większe w warunkach tlenu atmosferycznego. Francis i wsp. (2010) wykazali z kolei, że w standardowych warunkach dwuwymiarowej hodowli wstępne prekondycjonowanie hipoksyjne zwiększa potencjał neurogeny neuralnych komórek progenitorowych pochodzących z ludzkich zarodkowych komórek macierzystych (Francis i wsp., 2010). Ponadto, MSC izolowane ze szpiku kostnego szczura wykazywały zwiększoną ekspresję *GFAP* w hodowli w warunkach 21% O₂, podczas gdy obniżone stężenie tlenu powodowało zwiększoną ekspresję nestyny oraz β -Tubuliny III specyficznej dla neuronów (*TUJ-1*) (Wang i wsp., 2013).

Różne grupy badawcze udowodniły, że w warunkach obniżonego stężenia tlenu (2-5% O₂) komórki WJ-MSC wykazywały zwiększony potencjał proliferacyjny (Drela i wsp., 2014; Widowati i wsp., 2014; Obradovic i wsp., 2019; Tomecka, Lech i wsp., 2021), zachowując jednocześnie zdolność do wieloliniowego różnicowania i ekspresję mezenchymalnych markerów powierzchniowych (Nekanti i wsp., 2010). Badania prowadzone w ramach niniejszej rozprawy wykazały, że w przypadku standardowej hodowli komórek w monowarstwie (2D) warunki 5% O₂ spowodowały znaczący wzrost proliferacji, co zostało również zaobserwowane w przypadku hodowli komórek WJ-MSC w obu typach zastosowanych trójwymiarowych rusztowań LP i FB (**Ryc.22**). Dane literaturowe wskazują, że dodatkowym czynnikiem wpływającym na proliferację WJ-MSC w hodowli 3D jest stężenie stosowanego hydrożelu. Huang i wsp. (2020) wykazali, że tempo proliferacji komórek jest odwrotnie proporcjonalne do stosowanego stężenia hydrożelu. Jednocześnie, najszybsze tempo wzrostu obserwowano w hodowlach 2D (Huang i wsp., 2020). Podsumowując, badania tej pracy wykazały, że warunki 5% poziomu tlenu stwarzają bardziej stabilne i odpowiednie środowisko dla hodowli WJ-MSC.

7.1.3. Stymulacja czynnikami prozapalnymi

Dowodzono, że ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste izolowane z galarety Whartona mogą wydzielać szereg czynników przeciwzapalnych, przeciwapoptotycznych, angiogennych i neurogennych (Lech i wsp., 2016;

Obtułowicz i wsp., 2016; Capcha i wsp., 2018; Harrell i wsp., 2019). Analiza poziomu ekspresji badanych markerów: *BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*, *TGF-β1*, *IL-6* oraz *IL-1β* w komórkach WJ-MSC hodowanych w 2D oraz hydrożelowych skafoldach LP i FB w warunkach 21% lub 5% O₂ wykazała, że mikrośrodowisko 3D sprzyja zwiększeniu poziomu ekspresji mRNA dla wszystkich analizowanych genów w porównaniu do hodowli 2D. Zmianę w poziomie ekspresji zaobserwowano już po 24 godz. w hodowli 3D. Efekt ten utrzymywał się również w piątym dniu hodowli *in vitro* (**Ryc.26**).

Ciardulli i wsp. (2021) w swoich badaniach donoszą, iż komórki WJ-MSC hodowane w skafoldach fibrynowych wykazywały zwiększoną ekspresję na poziomie mRNA *IL-6*, *IL-10*, *TNF* i *TGF-β1* po 7, jak również po 14 dniach hodowli *in vitro*. Wyraźnie zwiększony poziom ekspresji był szczególnie obserwowany w dłuższej hodowli *in vitro*, zwłaszcza *TNF* i *IL-10*. W przypadku *IL-1β* zaobserwowano obniżenie poziomu ekspresji w odniesieniu do WJ-MSC hodowanych w 2D (Ciardulli i wsp., 2021).

Podobny do uzyskanego w ramach niniejszej rozprawy efekt wpływu trójwymiarowej hodowli na ekspresję wybranych genów obserwowano w innej populacji komórek ludzkich – BM-MSC. Komórki te w hydrożelach fibrynowych wykazywały zwiększoną ekspresję *IL-6*, *TNF*, *IL-10*, *IL-12A* i *IL-1β* w porównaniu do standardowej hodowli 2D. Poziom ekspresji przeciwzapalnego *TGF-β1* uległ natomiast obniżeniu (Ciardulli i wsp., 2020). W innych badaniach nad komórkami MSC izolowanymi ze szpiku kostnego, a następnie hodowanymi w warunkach 3D zaobserwowano z kolei spadek ekspresji m.in. *FGF2*, *IL-1β*, *IL-6*. Wzrost ekspresji *IL-10*, *TGF-β2*, czy *HGF* był natomiast indukowany w BM-MSC hodowanych w hydrożelach (Marusina i wsp., 2020). Komórki były jednak hodowane w warunkach atmosferycznego stężenia tlenu, dodatkowo w obecności surowicy zwierzęcej, co znacząco mogło wpłynąć na profil ekspresji analizowanych markerów.

Profil wydzielniczy komórek mezenchymalnych zależy od warunków środowiska, w którym się znajdują. W zależności od czynników występujących w mikrośrodowisku komórki mezenchymalne mogą przyjąć prozapalny lub przeciwzapalny fenotyp określany podobnie jak w przypadku makrofagów – MSC1 i MSC2 (Waterman i wsp., 2010; Betancourt i wsp., 2013; Wędzińska i wsp., 2021). MSC mają zdolność do zmiany fenotypu na immunomodulacyjny (MSC2) lub

prozapalny (MSC1) również poprzez stymulację odpowiednich receptorów Toll-podobnych (Mastri i wsp., 2012).

Aby ocenić, w jaki sposób komórki WJ-MSC po przeszczepie mogą zareagować na mikrośrodowisko zapalne, jakie tworzy się w obrębie uszkodzonej tkanki, postanowiono przeprowadzić stymulację komórek WJ-MSC czynnikami prozapalnymi w hodowli *in vitro*. Zastosowano w tym celu mediatory odpowiedzi zapalnej TNF α oraz IFN γ . Dodatkowo, sprawdzono również, w jaki sposób różni się odpowiedź komórek WJ-MSC na czynniki prozapalne w zależności od warunków ich hodowli (2D vs. 3D) oraz czy zastosowana prestymulacja spowoduje polepszenie parametrów wydzielniczych komórek.

W komórkach WJ-MSC, które były stymulowane czynnikami prozapalnymi zarówno w warunkach standardowej hodowli (2D) jak i hodowli trójwymiarowej, zaobserwowano znaczący wzrost ekspresji *BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*, *TGF- β 1*, *IL-6* oraz *IL-1 β* w porównaniu do komórek hodowanych w warunkach kontrolnych bez czynników stymulujących. W warunkach, które mają na celu próbę odwzorowania mikrośrodowiska zapalnego, do którego przeszczepiane są komórki (czyli hodowla 2D, a następnie zawieszenie komórek w hydrożelach z dodatkiem czynników prozapalnych – prekondycjonowanie nr 2, **Ryc.4**), zaobserwowano wzrost ekspresji badanych markerów w porównaniu do standardowej hodowli 2D, a także 3D hodowli kontrolnej (**Ryc.28 A, B**). Prestymulacja komórek WJ-MSC przy użyciu TNF α oraz IFN γ już na etapie warunków 2D, a następnie dodatkowo w hodowli 3D (prekondycjonowanie nr 3), skutkowało dodatkowo wyraźnie zwiększoną ekspresją wszystkich badanych neurotrofin i cytokin (**Ryc.28 C**). Interesujące jest, iż warunki hodowli 3D wyraźnie zwiększyły odpowiedź komórek WJ-MSC na zastosowanie czynników prozapalnych. Skutkowało to znacznie zwiększonym poziomem ekspresji wszystkich badanych czynników w porównaniu do poziomu ekspresji obserwowanego w WJ-MSC hodowanych w warunkach standardowych 2D (**Ryc.27-28**). Zaobserwowano również różnice w ekspresji badanych markerów w WJ-MSC w zależności od typu skafoldu (prekondycjonowanie nr 1): w komórkach hodowanych w skafoldach LP zaobserwowano zwiększoną ekspresję *VEGF-A* w porównaniu do komórek hodowanych w skafoldach FB. Natomiast ekspresja *BDNF*, *IL-6* oraz *IL-1 β* była wyższa w grupie 3D FB niż obserwowana w 3D LP. Poziom ekspresji *TGF- β 1* oraz *GDNF* utrzymywał się na podobnym poziomie w komórkach hodowanych w obu

typach skafoldów. Najbardziej korzystnym sposobem wstępnego przygotowania komórek przed przeszczepem wydaje się być prestymulacja komórek WJ-MSC czynnikami zapalnymi już na etapie warunków 2D, co zostanie z kolei wzmocnione przez enkapsulację komórek w hydrożelach (prekondycjonowanie nr 3, **Ryc.28 C**). Warunki te imitują okoliczności, gdy tak przygotowane komórki, eksponowane na czynniki zapalne wydzielane przez mikrośrodowisko uszkodzonej tkanki, mogą znacząco wpływać na finalny efekt terapeutyczny. W zastosowanym modelu *in vitro*, ten wariant eksperymentalny (stymulacja 2D + dodatkowa stymulacja 3D, prekondycjonowanie nr 3) skutkowało uzyskaniem najwyższego poziomu ekspresji badanych neurotrofin i cytokin.

Badania te zostały również potwierdzone przez inny zespół badaczy. Stymulacja komórek WJ-MSC czynnikami zapalnymi, w tym IFN γ , TNF α oraz IL-1 β wyraźnie wpłynęła na profil sekrecyjny komórek. Zauważono, iż stężenie IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 wydzielonych przez WJ-MSC do pożywki wyraźnie wzrosło w następstwie stymulacji czynnikami prozapalnymi komórek hodowanych w obu wariantach tlenowych – 21% O $_2$ oraz fizjologicznej normoksji (5% O $_2$). W warunkach kontrolnych nie zaobserwowano w ogóle wydzielania IL-6, IL-10, czy IL-12 przez WJ-MSC (Wędzińska i wsp., 2021).

W innych badaniach wykazano, iż czynniki wydzielane przez prozapalne i przeciwzapalne makrofagi aktywowały – we współhodowli pośredniej – potencjał immunomodulacyjny komórek MSC izolowanych ze szpiku kostnego. Działanie immunoregulacyjne MSC uległo wzmocnieniu w następstwie wysiania komórek w hydrożelach wykonanych z kolagenu. Enkapsulacja MSC w skafoldach zwiększyła wydzielanie PGE2 i wzmogła immunomodulację makrofagów, osłabiając ich stan prozapalny i podtrzymując aktywację przeciwzapalną (Saldaña i wsp., 2019).

7.2. WJ-MSC w hodowli organotypowej *ex vivo* wykazują działanie neuroprotektoryjne na poziomie tkanki (eksperyment „*proof of concept*” nr 1)

Zastosowanie hodowli organotypowej skrawków hipokampa szczura umożliwia wykonanie eksperymentu „*proof of concept*”, w którym badany jest potencjał terapeutyczny WJ-MSC na poziomie tkanki nerwowej.

W celu zweryfikowania odpowiedzi komórek na czynniki wydzielane przez środowisko uszkodzonej tkanki nerwowej, zastosowano eksperymentalny model ischemicznego uszkodzenia mózgu *ex vivo*. Efekt neuroprotekcyny był najbardziej widoczny, gdy komórki były prekondycjonowane w warunkach 5% O₂, a następnie hodowane w skafoldach fibrynowych. Właściwości neuroprotekcyny komórek WJ-MSC hodowanych w warunkach atmosferycznych (21% O₂) były zbliżone w obu zastosowanych rodzajach rusztowań. Neuroprotekcyny efekt komórek WJ-MSC uzyskano w warunkach hodowli pośredniej, pozbawionej bezpośredniego kontaktu między uszkodzonymi skrawkami hipokampa i WJ-MSC, co potwierdza silny, parakryny mechanizm działania komórek. Identyfikacja efektu neuroprotekcyny i zmniejszoną śmiertelność neuronów w regionie CA1 zaobserwowano po współhodowli uszkodzonych OHC z neuralnymi komórkami macierzystymi/progenitorowymi izolowanymi z krwi pępowinowej (HUCB-NSC, ang. *Human Umbilical Cord Blood-derived Neural Stem/Progenitor Cells*) (Sarnowska i wsp., 2009). Również w przypadku współhodowli OHC z progenitorami endotelialnymi pochodzącymi z galarety Whartona (WJ-EPC, ang. *Wharton's Jelly Endothelial Progenitor Cells*) zaobserwowano zmniejszoną śmiertelność neuronów (Obtułowicz i wsp., 2016).

Interesujące jest, iż komórki WJ-MSC w skafoldach LP i FB w hodowli *in vitro* wykazywały wyraźnie zwiększoną ekspresję *IL-1β*, jednak poziom ekspresji tej interleukiny w następstwie ekspozycji na uszkodzoną tkankę nerwową wyraźnie się różnił. Ekspozycja WJ-MSC zawieszonych w hydrożelach na czynniki wydzielane przez uszkodzone skrawki hipokampa szczura spowodowała znacznie zmniejszoną ekspresję prozapalnej *IL-1β* z jednocześnie podwyższoną ekspresją przeciwzapalnego *TGF-β1* w porównaniu do komórek z kontrolnej hodowli 2D (**Ryc.29**). Wyniki te sugerują potencjalny efekt protekcyny i zmniejszenie odpowiedzi zapalnej będące rezultatem prekondycjonowania komórek w warunkach fizjologicznej normoksji i zastosowania mikrośrodowiska 3D. Zostało to dodatkowo wzmocnione poprzez stymulację komórek czynnikami zapalnymi wydzielanymi przez uszkodzoną tkankę.

Komórki WJ-MSC wstępnie prekondycjonowane w warunkach fizjologicznej normoksji (5% O₂) i hodowane z wykorzystaniem hydrożelowych skafoldów, w porównaniu z WJ-MSC hodowanymi w warunkach 21% O₂ oraz 2D, wykazały zatem zwiększone działanie neuroprotekcyny. Dodatkowo, uzyskane

wyniki wskazują na modulację odpowiedzi zapalnej oraz sugerują, iż odpowiednia hodowla komórek przed przeszczepem może skutecznie wspomagać proces regeneracji uszkodzonej tkanki (**Ryc.26-30**). Wykazano wcześniej, że zastosowanie warunków 3D z wykorzystaniem skafoldów opartych na strukturze hydrożelu sprzyja zwiększaniu ekspresji mRNA i produkcji białek czynników immunologicznych niż standardowe warunki 2D (Li i wsp., 2019). W komórkach mezenchymalnych hodowanych na rusztowaniach dochodziło do zwiększenia ekspresji cytokin przeciwzapalnych, takich jak prostaglandyny E2, *TSG-6* oraz zmniejszenia ekspresji cytokin prozapalnych, m.in. *IL-6* czy *MCP-1* (Chen i wsp., 2019). Co więcej, WJ-MSC zamknięte w rusztowaniach zmniejszały odpowiedź immunologiczną na implantację podskórną (Li i wsp., 2019).

Warto zauważyć, że w badaniach zawartych w prezentowanej pracy poziom ekspresji *IL-6* w komórkach WJ-MSC hodowanych w rusztowaniach w warunkach fizjologicznej normoksji (5% O₂) uległ zmniejszeniu w porównaniu do obserwowanego w warunkach atmosferycznych (21% O₂). Jednak efekt ten był całkowicie odwrotny, gdy WJ-MSC osadzone w hydrożelach zostały wystawione na działanie czynników produkowanych przez uszkodzoną tkankę nerwową. Sugeruje to stymulację właściwości immunomodulujących komórek WJ-MSC przez połączenie wstępnego kondycjonowania komórek odpowiednimi warunkami biomimetycznymi oraz czynnikami obecnymi w mikrośrodku zapalnym. Świadczy to o istotnym wpływie środowiska uszkodzonej tkanki na profil odpowiedzi komórek mezenchymalnych.

7.3. Potencjał terapeutyczny WJ-MSC *in vivo* (przeszczep do uszkodzonego mózgu szczura) zależy od sposobu podania komórek i warunków hodowli przed transplantacją (eksperyment „*proof of concept*” nr 2)

Zastosowanie eksperymentalnego modelu udaru mózgu szczura umożliwia wykonanie eksperymentu „*proof of concept*”, w którym badany jest potencjał terapeutyczny WJ-MSC na poziomie organizmu biorcy.

Pozytywne wyniki dotyczące właściwości neuroprotektoryjnych i regeneracyjnych WJ-MSC uzyskane w trakcie prowadzenia badań *in vitro* i *ex vivo* skłoniły do rozszerzenia eksperymentów również o doświadczenia *in vivo*. W tym celu zastosowano eksperymentalny model udaru mózgu oparty na iniekcji ouabainy – inhibitora pompy sodowo-potasowej (Janowski i wsp., 2008). Badania

na zwierzętach doświadczalnych obejmowały odpowiedź tkankową szczura na wywołane uszkodzenie mózgu oraz na przeszczep komórek WJ-MSC, które były hodowane w warunkach 21% O₂ lub 5% O₂, a następnie podane w soli fizjologicznej lub w skafoldach z lizatu płytkowego bądź fibrynogenu. Jeden z celów tej pracy zakładał porównanie przydatności wybranych skafoldów hydrożelowych do wykorzystania podczas przeszczepu komórek do uszkodzonego ośrodkowego układu nerwowego. Tego rodzaju hydrożelowe rusztowania były już wcześniej wykorzystywane w badaniach dotyczących regeneracji mięśni szkieletowych oraz ubytków kostnych (Altaie i wsp. 2016; Santos i wsp. 2018).

Hydrożele zastosowane w niniejszej pracy zostały wykonane z białek ludzkiego osocza. Dzięki płynnej konsystencji poszczególnych składników badanych skafoldów, możliwa była ich iniekcja bezpośrednio do uszkodzonego mózgu szczura, gdzie dopiero po podaniu w miejsce lezji skafoldy ulegały żelowaniu i tworzyły trójwymiarową strukturę. W warunkach *in vitro* ten proces trwał około 10 minut w przypadku skafoldów LP oraz około 1 minuty w przypadku skafoldów FB. Płynna postać podawanych skafoldów zasiedlonych komórkami ograniczyła uszkodzenia mechaniczne tkanki, których nie można byłoby dodatkowo uniknąć w przypadku przeszczepiania innego typu skafoldów, nie opartych na strukturze hydrożelu. Komórki WJ-MSC zawieszona w skafoldach można było zatem podać w identyczny sposób, jak komórki zawieszona w soli fizjologicznej (2D). Zważywszy na fakt, iż w badaniach *in vitro* i *ex vivo*, prestymulacja komórek w warunkach fizjologicznej normoksji wpłynęła znacząco na profil ekspresji badanych genów oraz właściwości neuroprotektoryjne WJ-MSC, komórki przed podaniem do uszkodzonego mózgu szczura również były hodowane w dwóch różnych warunkach – atmosferycznego stężenia tlenu oraz 5% O₂.

W pierwszej kolejności oceniano umiejscowienie przeszczepionych WJ-MSC w uszkodzonym mózgu szczura poprzez obrazowanie w rezonansie magnetycznym. Komórki pozostawały w miejscu podania, niezależnie od sposobu ich transplantacji. Nie zaobserwowano migracji WJ-MSC do innych struktur mózgu poza uszkodzonym prążkiem, do którego wykonano przeszczep (**Ryc.32-33**). Fakt, iż komórki pozostają dokładnie w miejscu ich transplantacji jest korzystny ze względu na ich neuroprotektoryjne działanie parakryne obserwowane już wcześniej w badaniach *ex vivo*. Sygnał generowany przez nanocząstki tlenu żelaza, którymi były znakowane WJ-MSC był obserwowany po 1, 7, 14 i 21 dniach

od wykonania przeszczepu. Badanie immunohistochemiczne potwierdziło ich lokalizację wokół miejsca uszkodzenia (**Ryc.35**). Jednakże, jednoznaczna ocena, czy obserwowany w MRI sygnał pochodzi z żywych komórek WJ-MSC, czy też ze sznurzych makrofagów, które sfagocytowały resztki komórek WJ-MSC wraz z żelazem, konieczne jest wykonanie dalszych badań, które nie były przedmiotem niniejszej rozprawy.

Poza wykonaniem standardowego obrazowania w MRI (TurboRARE-T2) wykonano dodatkowo obrazowanie zależne od dyfuzji, które jest metodą pozwalającą na bardzo wczesne wykrycie zmian udarowych. Opiera się na wykorzystaniu właściwości dyfuzyjnych cząsteczek wody w przestrzeni międzykomórkowej. Poszczególne obszary mózgowia dotknięte zmianami niedokrwiennymi wykazują zmniejszoną dyfuzję na skutek zmian w przepuszczalności błon komórkowych i nagromadzenia się jonów sodu. Prowadzi to do zaburzenia i zahamowania swobodnych ruchów Browna w miejscu udaru i zmiany obrazu DWI (Szewczyk i wsp., 2008). W wyniku uszkodzenia mózgu indukowanego ouabainą zaobserwowano zanik dyfuzji w miejscu objętym urazem. Po podaniu komórek WJ-MSC w soli fizjologicznej i skafoldach LP oraz FB zauważono wyraźny sygnał w miejscu lezji, którego nie odnotowano w grupach sham (**Ryc.32-33**). Zaobserwowany w obrazowaniu zależnym od dyfuzji sygnał może wskazywać na obecność żywych komórek WJ-MSC, gdzie zachodzi prawidłowa dyfuzja cząsteczek wody.

Kolejno analizowano wpływ przeszczepionych komórek na wielkość uszkodzenia mózgu szczura w różnych punktach czasowych od powstałego urazu i transplantacji WJ-MSC. Zaobserwowano, iż w wyniku podania komórek wielkość uszkodzenia mózgu uległa wyraźnemu zmniejszeniu, zwłaszcza w przypadku podania WJ-MSC w skafoldach hydrożelowych w porównaniu do komórek przeszczepianych w soli fizjologicznej. Szczególnie jest to widoczne po 21 dniach od podania komórek (**Ryc.34**). Wskazuje to na silny efekt ochronny komórek MSC, skutkujący zmniejszeniem obszaru objętego urazem. Komórki wysiane w skafoldach, dzięki dodatkowej ochronie przed działaniem komórek układu odpornościowego biorecy oraz właściwościom immunomodulacyjnym mogą efektywniej działać w strefie półcienia (penumbra), która bezpośrednio otacza strefę martwicy. Penumbra stanowi strategiczny obszar, w obrębie którego wdrożenie terapii w następstwie udaru niedokrwiennego może przynieść

oczekiwane korzyści. Najważniejszy jest jednak czas reakcji od wystąpienia objawów, gdyż wdrożenie jak najwcześniejszego leczenia jest kluczowe w terapii udaru (Sodaei i wsp., 2020). Powiększający się obszar uszkodzenia w następstwie iniekcji ouabainy, bez wdrożonego postępowania terapeutycznego wynosił aż $54,31 \pm 4,03\%$ powierzchni półkuli po 21 dniach od powstałego urazu. Istotne zmniejszenie obszaru uszkodzenia w następstwie podania komórek WJ-MSC w skafoldach LP ($38,71 \pm 1,66\%$) oraz FB ($35,48 \pm 0,73\%$) może wskazywać na silne neuroprotektoryjne działanie przeszczepionych komórek w strefie półcienia. W efekcie nie doszło do uszkodzenia neuronów w tym rejonie, co zwykle jest następstwem powiększającego się obszaru martwicy po udarze.

W badaniach prowadzonych w Zakładzie Bioinżynierii Komórek Macierzystych zaobserwowano już wcześniej pozytywny efekt przeszczepianych komórek WJ-MSC oraz WJ-EPC, szczególnie podawanych w skafoldach wykonanych z lizatu płytkowego. Obszar uszkodzenia stanowił mniejszy procent niż w przypadku podania pustych skafoldów oraz bez wdrażania terapii komórkowej. Podanie WJ-MSC/WJ-EPC skutkowało również ograniczeniem tworzenia blizny glejowej (Obtułowicz 2017, dane nieopublikowane).

W badaniach Li i wsp. (2021) hydrożel żelatynowy podwójnie usieciowany enzymatycznie przez peroksydazę chrzanową i oksydazę cholinową został wykonany jako możliwe do podania na drodze iniekcji rusztowanie dla mysich mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego w leczeniu urazowego uszkodzenia mózgu. Uzyskane przez nich wyniki wykazały, iż hydrożelowy skafold może promować żywotność komórek, różnicowanie neuronalne i wydzielanie neurotrofin przez BM-MSC. Testy *in vivo* na modelu TBI myszy C57BL/6 potwierdziły, że skafoldy żelatynowe wraz z wysianymi komórkami BM-MSC mogą znacznie zmniejszyć uszkodzony obszar mózgu, złagodzić stan zapalny oraz apoptozę neuronów, ułatwić przeżycie i proliferację endogennych komórek nerwowych oraz promować przywracanie funkcji neurologicznych (Li i wsp., 2021).

W innych badaniach wykorzystywano hydrożel składający się z alginianu sodu i kwasu hialuronowego, jako rusztowanie dla stworzenia lepszego mikrośrodowiska dla komórek macierzystych po implantacji. Komórki MSC izolowane z galarety Whartona były przeszczepiane do szczurów Sprague Dawley w następstwie urazowego uszkodzenia mózgu. Skutkowało to znacznym powrotem

zdolności motorycznych zwierząt już po 14 dniach od podania komórek, co było dodatkowo wzmocnione w przypadku transplantacji WJ-MSC w hydrożelach. Ponadto, analiza histologiczna wykazała obecność większej liczby komórek WJ-MSC po podaniu wewnątrz hydrożeli, co sugeruje, że zastosowane rusztowanie chroniło komórki i umożliwiło migrację w miejsce lezji. W efekcie podania komórek w skafoldach wzrosła również ekspresja β -Tubuliny III oraz markera komórkowej proliferacji Ki67 w hipokampie szczura (Zhang i wsp., 2018).

Po uszkodzeniu mózgu zaobserwowano wyraźnie zwiększoną ekspresję szczurzych *BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*, *TGF- β 1*, *IL-6*, *IL-1 β* , szczególnie w krótkim czasie (24 godz.) od wywołania urazu w porównaniu do kontroli (**Ryc.36**). Wskazuje to na silną aktywację układu immunologicznego i uruchomienie procesu regeneracji. W wyniku powstałego uszkodzenia, dochodzi do mobilizacji układu immunologicznego, nerwowego i hormonalnego, co jest kluczowe dla prawidłowego procesu regeneracji danej tkanki (Gryglewski i wsp., 2006). Wyraźnie zwiększona ekspresja *IL-6* oraz *IL-1 β* jest tutaj efektem rozwijającego się stanu zapalnego. Wzrost ekspresji *BDNF*, *GDNF* oraz *VEGF-A* i przeciwzapalnego *TGF- β 1* w wyniku urazu wskazuje z kolei na uruchomienie endogennego procesu neuro- i naczynioprotekcyjnego oraz modulację reakcji zapalnej, szczególnie, że najwyższy poziom ekspresji *TGF- β 1* obserwowano nie bezpośrednio po uszkodzeniu mózgu, lecz po 7 dniach od powstałego urazu.

Efektom uszkodzenia tkanki jest proces gojenia, na który składa się faza zapalenia, proliferacji i migracji komórek oraz przebudowy tkanki. Dochodzi do aktywacji m.in. makrofagów oraz komórek progenitorowych. Kluczową rolę w tym procesie odgrywają czynniki takie jak: *TGF- β* , *bFGF*, naskórkowy czynnik wzrostu (*EGF*, ang. *Epidermal Growth Factor*), *VEGF-A*, *IL-4*, *IL-10* (Pikuła i wsp., 2015). W przypadku uszkodzenia mózgu dochodzi do aktywacji astrogleju i powstania blizny glejowej. Niestety, jest to tkanka znacznie zmieniona histologicznie i nie zapewnia już funkcjonalnego połączenia z otaczającą ją tkanką zdrową. Transplantacja komórek macierzystych w miejsce powstałego urazu może stymulować proces regeneracji endogennej tkanki. Zostało to szczególnie zaobserwowane po podaniu komórek WJ-MSC hodowanych w warunkach fizjologicznej normoksji i przeszczepionych w skafoldach z lizatu płytkowego (**Ryc.37-38**). Porównując uzyskane wyniki do poziomu ekspresji badanych markerów w uszkodzonym prążkowie szczura, gdzie nie zastosowano terapii

komórkowej, można wnioskować, iż komórki WJ-MSC wykazują silne działanie protekcyjne i proregeneracyjne względem tkanki objętej urazem. Ciekawy wynik uzyskano po 24 godz. od podania komórek, gdzie nie zaobserwowano istotnego statystycznie wzrostu poziomu ekspresji żadnego z analizowanych genów, niezależnie od wcześniejszych warunków hodowli komórek *in vitro* oraz metody ich transplantacji do mózgu, z wyjątkiem przeciwzapalnego *TGF-β1*. Ekspresja badanych szczurzych neurotrofin (*BDNF*, *GDNF*) uległa wzrostowi dopiero po 7 dniach od podania komórek WJ-MSC i utrzymywała się na zwiększonym poziomie również po 14, jak i po 21 dniach od przeszczepu. Natomiast poziom ekspresji *VEGF-A* uległ zwiększeniu dopiero po 14 i po 21 dniach od podania WJ-MSC. Może to sugerować, iż neuroprotekcyjny efekt podania komórek WJ-MSC zaczyna istotnie wpływać na uszkodzoną tkankę dopiero po kilku dniach od przeszczepu. Szczególnie interesujący wynik uzyskano z kolei dla poziomu ekspresji *IL-6* oraz *IL-1β*. Poziom ekspresji *IL-6* uległ obniżeniu po podaniu komórek WJ-MSC i utrzymywał się na tym poziomie również w kolejnych tygodniach od przeszczepu. Natomiast w przypadku *IL-1β* zaobserwowano wyraźny spadek poziomu ekspresji tuż po podaniu WJ-MSC. W kolejnych dniach analizy obserwowano wzrost ekspresji *IL-1β* głównie po podaniu komórek w soli fizjologicznej. Po 21 dniach od przeszczepu nadal obserwowano wysoki poziom ekspresji szczurzej *IL-1β*, ale dodatkowo efekt ten odnotowano także w przypadku podania WJ-MSC w skafoldach. Najprawdopodobniej jest to spowodowane pierwotnym brakiem dostępności przeszczepionych WJ-MSC dla komórek układu immunologicznego biorcy, natomiast stopniowa degradacja skafoldów po przeszczepie skutkowałą uwolnieniem komórek WJ-MSC do uszkodzonej tkanki i reakcją układu immunologicznego.

W celu dokładnej weryfikacji odpowiedzi organizmu biorcy na wykonany przeszczep komórek WJ-MSC, postanowiono dodatkowo ocenić poziom wydzielanych neurotrofin oraz cytokin pro- i przeciwzapalnych w płynie mózgowo-rdzeniowym (PMR) szczura. Płyn mózgowo-rdzeniowy bierze udział w fizjologicznej kontroli mózgu i odzwierciedla patofizjologię różnych zaburzeń neurologicznych ośrodkowego układu nerwowego. Po przeszczepie komórek macierzystych w modelu udaru, ilościowa analiza zmian proteomu płynu mózgowo-rdzeniowego może potencjalnie wykazać terapeutyczny wpływ komórek macierzystych na OUN gospodarza (Hur i wsp., 2021).

Dynamika zmian stężenia TGF- β 1 w płynie mózgowo-rdzeniowym szczura po uszkodzeniu ogniskowym oraz podaniu komórek WJ-MSC pokrywa się z wynikami uzyskanymi dla ekspresji tego markera na poziomie mRNA w tkance (**Ryc.37-39**). Po 24 godz. od przeszczepu zaobserwowano wyraźny wzrost stężenia TGF- β 1 w PMR, który utrzymywał się na wysokim poziomie również po 7, 14 oraz 21 dniach od podania komórek, głównie w skafoldach w porównaniu do WJ-MSC przeszczepianych w soli fizjologicznej.

Interesujący wynik ilości badanych białek w PMR uzyskano po 24 godz. od podania komórek WJ-MSC do uszkodzonego mózgu szczura. W tym wypadku stężenie BDNF i GDNF w PMR obserwowano na znacznie wyższym poziomie niż dla ekspresji tych neurotrofin na poziomie mRNA w *striatum* szczura. W toczącym się lokalnie procesie zapalnym spowodowanym uszkodzeniem mózgu dochodzi do śmierci komórek nerwowych. Dopiero w kolejnych dniach od udaru i przeszczepie WJ-MSC wzrasta ekspresja neurotrofin spowodowana uruchomieniem procesu regeneracji, który jest dodatkowo stymulowany przez komórki WJ-MSC. Wysokie stężenie BDNF i GDNF w PMR już po 24 godz. może być wynikiem ogólnoustrojowej odpowiedzi organizmu na lokalne uszkodzenie tkanki i uruchomieniem procesu endogennej neurogenezy. W badaniach Tan i wsp. (2021) wykazano, iż zwiększony poziom BDNF w płynie mózgowo-rdzeniowym szczurów jest związany z indukcją neurogenezy w strefie okołokomorowej w odpowiedzi na uszkodzenie niedokrwienne mózgu (Tan i wsp., 2021).

Stan zapalny jest cechą charakterystyczną patologii udaru mózgu. Cytokiny, takie jak TNF, IL-1 i IL-6, modulują uszkodzenie tkanek w doświadczalnym modelu udaru i są potencjalnymi celami przyszłej terapii. Wpływ tych cytokin na rozwój uszkodzenia zależy od ich występowania w strefie półcienia we wczesnej fazie udaru (Lambertsen i wsp., 2012). Stężenie IL-6 w PMR szczura po podaniu WJ-MSC obserwowano na niższym poziomie niż po uszkodzeniu ogniskowym bez podania komórek. Podobny efekt zaobserwowano w badaniach dotyczących poziomu ekspresji tej interleukiny w uszkodzonej tkance (**Ryc.37-39**). Dla IL-1 β zaobserwowano z kolei niskie stężenie w płynie mózgowo-rdzeniowym szczura, w przeciwieństwie do ekspresji tej interleukiny prozapalnej na poziomie mRNA w uszkodzonej tkance (**Ryc.37-39**). Najprawdopodobniej wskazuje to na jedynie lokalne ograniczenie procesu zapalnego wywołanego uszkodzeniem ogniskowym, który nie jest wykrywany na poziomie ogólnoustrojowym. W połączeniu

z wysokim stężeniem TGF- β 1 w PMR oraz tkance po podaniu komórek, głównie po 24 godz., które utrzymuje się również na wysokim poziomie po 7, 14 oraz 21 dniach od przeszczepu może to wskazywać na uruchomienie mediatorów reakcji zapalnej w celu obniżenia ogólnoustrojowej odpowiedzi na toczący się stan zapalny.

Podobne wyniki zostały również uzyskane przez innych badaczy. W badaniach Torre-Espin i wsp. (2013) komórki BM-MSK pozyskiwane ze szczurów Sprague-Dawley i przeszczepione natychmiast po uszkodzeniu rdzenia kręgowego powodowały wzrost ekspresji genów związanych z ochroną i regeneracją tkanek. W przypadku podania komórek 7 dni od wystąpienia urazu, komórki MSC powodowały spadek ekspresji genów związanych z regeneracją tkanek. Najważniejszą zmianą po przeszczepie MSC był wyraźny wzrost ekspresji genów związanych z odpowiedzią na ciało obce i adaptacyjną odpowiedzią immunologiczną. W odniesieniu do MSC zasugerowano ponadto, że efekty terapeutyczne w uszkodzeniu rdzenia kręgowego wynikają z ich zdolności do wydzielania i/lub indukowania ekspresji cząsteczek ochronnych, takich jak BDNF i GDNF, do modulowania stanu zapalnego i tworzenia bardziej sprzyjającego środowiska dla regeneracji aksonów i rekonstrukcji tkanki nerwowej (Torres-Espín i wsp., 2013).

W innych badaniach, przeszczep ludzkich BM-MSK do szczurów z udarem niedokrwinnym mózgu indukowanym zamknięciem tętnicy środkowej mózgu po 24 godz. od wywołania uszkodzenia hamował aktywację NF- κ B, prawdopodobnie poprzez inhibicję CD40 i TLR2, które mogą być z kolei odpowiedzialne za hamowanie ekspresji genów prozapalnych. Zaobserwowano także zmniejszoną ekspresję ED1, IL-1 β , oraz MCP1 po podaniu komórek izolowanych ze szpiku kostnego (Wang i wsp., 2013). W badaniach innej grupy, również z wykorzystaniem tego samego modelu udaru, szczury które otrzymały przeszczep komórek MSC wykazywały lepszą regenerację czynnościową i zmniejszoną wielkość uszkodzenia mózgu w 7 i 14 dniu po MCAO. W mózgu zwierząt po przeszczepieniu MSC, komórki gospodarza wykazywały znacznie wyższą ekspresję czynników neurotroficznych, zwłaszcza VEGF po 3 dniach od urazu oraz EGF i bFGF po 7 dniach od MCAO. Przeszczepione ludzkie MSC wywoływały poprawę czynnościową i neuroprotekcję u szczurów z niedokrwieniem prawdopodobnie przez dostarczenie IGF-1 i indukcję endogennych czynników

VEGF, EGF i bFGF w mózgu gospodarza (Wakabayashi i wsp., 2010). W badaniach Pirzad i wsp. (2015) ogniskowe uszkodzenie mózgu indukowano u szczurów przez umieszczenie wytworzonego skrzepu w tętnicy środkowej mózgu. Zwierzętom podano dożylnie komórki BM-MSC 24 godz. po udarze i uśmiercono po 7 dniach. Po podaniu BM-MSC wynik neurologiczny uległ znacznej poprawie w porównaniu z grupą kontrolną. Nastąpił wzrost liczby BM-MSC obecnych w uszkodzonej półkuli mózgu w porównaniu ze stroną nieuszkodzoną. Ponadto, podanie komórek MSC prowadziło również do wzrostu astrocytozy, unaczynienia i endogennej proliferacji (Pirzad i wsp., 2015). Podsumowując, ze względu na złożoność patofizjologii uszkodzenia mózgu w wyniku udaru, metody leczenia powinny uwzględniać wiele czynników, ostatecznie mając na celu promowanie ochrony tkanek, odbudowę aksonów i regenerację czynnościową.

Mechanizm działania przeszczepianych w ramach niniejszej pracy WJ-MSC prawdopodobnie polega w pierwszej kolejności na modulacji reakcji zapalnej organizmu biorcy, a następnie stymulacji komórek endogennych, co skutkuje przyspieszeniem procesu regeneracji uszkodzonej tkanki. Prowadzi to do wzrostu poziomu ekspresji neurotrofin, takich jak *BDNF* czy *GDNF*, a w ostatnim etapie do zwiększenia ekspresji *VEGF-A*. Biorąc pod uwagę głównie działanie parakryne przeszczepionych komórek, nie zaś ich różnicowanie i integrację z tkanką docelową, proponowany proces jest wysoce prawdopodobny.

Wykorzystanie hydrożelowych skafoldów jako nośników dla komórek macierzystych wydaje się być wyjątkowo obiecującą strategią terapeutyczną do zastosowania w medycynie regeneracyjnej. Jeszcze skuteczniejsze jest odpowiednie przygotowanie komórek przed transplantacją w wyniku ich prekondycjonowania w warunkach fizjologicznej normoksji. Dodatkowa stymulacja komórek czynnikami prozapalnymi tuż przed przeszczepem może odpowiednio pobudzić komórki do wydzielania czynników immunomodulacyjnych i regeneracyjnych, przekładając się tym samym na zwiększenie efektu terapeutycznego. W związku ze zwiększającym się zainteresowaniem wykorzystania komórek macierzystych w terapii chorób układu nerwowego, powyższe aspekty powinny być uwzględnione podczas opracowywania protokołów izolacji, hodowli i metody transplantacji komórek w badaniach dotyczących walidacji produktów leczniczych terapii zaawansowanej.

Podsumowanie

Badania in vitro:

- Zaproponowane modele hydrożelowe skafoldów tworzą strukturę umożliwiającą enkapsulację komórek (osadzenie się i przeżycie wewnątrz skafoldu) oraz migrację poza jego granice
- Komórki WJ-MSC wykazują liniowe tempo wzrostu w warunkach 2D oraz 3D. Typ skafoldów nie miał znaczącego wpływu na szybkość proliferacji, ale końcowa liczba komórek w rusztowaniach FB hodowanych w obu stężeniach tlenu była nieco większa (brak istotności statystycznej) niż w przypadku rusztowań LP
- Komórki rosnące w strukturze skafoldów tworzą wypustki, które obserwowano we wszystkich punktach czasowych hodowli do 7 dnia analizy, co wskazuje na możliwość tworzenia sieci komórek i ich wzajemnej interakcji. Skafoldy LP znacząco zmniejszyły swoje rozmiary po 48 godz. hodowli, natomiast wielkość rusztowań FB nie zmieniła się przez cały czas trwania eksperymentu
- W hodowlach 3D vs. 2D ekspresja badanych cytokin (*BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*, *TGF- β 1*, *IL-6*, *IL-1 β*) na poziomie mRNA uległa znaczącemu zwiększeniu już po 24 godz., co utrzymywało się w trakcie kilkudniowej hodowli *in vitro*, zarówno w warunkach 21% jak i 5% stężenia tlenu
- W komórkach WJ-MSC hodowanych w skafoldach LP i FB zaobserwowano zwiększoną ekspresję markerów neuralnych (nestyny, β -Tubuliny III, NF-200 i GFAP) na poziomie mRNA oraz białka. Poziom stężenia tlenu wpływał na kierunek różnicowania neuralnego WJ-MSC: przy stężeniu tlenu na poziomie 21% zaobserwowano tendencję do zwiększonego różnicowania w kierunku glejowym (znaczący wzrost ekspresji *GFAP*). Fizjologiczna normoksja (5% O₂) sprzyjała zwiększonej ekspresji markera neuralnych komórek macierzystych – nestyny oraz *NF-200*, markera różnicowania w kierunku neuronów
- Stymulacja czynnikami prozapalnymi (TNF α + IFN γ) komórek WJ-MSC zarówno w warunkach 2D jak i 3D wywołała znaczący wzrost ekspresji markerów stanu zapalnego: *IDO-1* oraz *TSG-6*
- Stymulacja czynnikami prozapalnymi (TNF α + IFN γ) komórek WJ-MSC zarówno w warunkach 2D jak i 3D, wywołała znaczący wzrost ekspresji

zarówno czynników troficznych (*BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*, *TGF- β 1*) jak i cytokin prozapalnych (*IL-6* oraz *IL-1 β*), przy czym w warunkach stymulacji komórek w hodowli 2D, a następnie 3D (prekondycjonowanie nr 3) odpowiedź była najsilniejsza

- W każdym badanym wariancie stymulacji czynnikami prozapalnymi warunki 3D istotnie zwiększyły ekspresję wszystkich badanych neurotrofin i cytokin w komórkach WJ-MSK w porównaniu do hodowli 2D

Badania ex vivo:

- W skrawkach OGD hipokampa szczura po współhodowli z WJ-MSK zawieszonymi w skafoldach wystąpiła zmniejszona śmiertelność komórek w porównaniu do kontroli (skrawki OGD bez WJ-MSK)
- Komórki hodowane w hydrożelowych skafoldach zarówno w warunkach 21%, jak i 5% stężenia tlenu wykazały silne działanie protekcyjne względem uszkodzonych skrawków organotypowych hipokampa szczura. Najsilniejsze działanie protekcyjne wykazały komórki z 5% tlenu hodowane w skafoldach z fibrynogenu
- Komórki WJ-MSK w warunkach 3D (skafoldy LP i FB), po współhodowli z uszkodzonymi skrawkami hipokampa wykazywały istotny wzrost ekspresji czynników troficznych (*GDNF*, *VEGF-A*) oraz spadek ekspresji cytokin prozapalnych (*IL-1 β*), przy jednoczesnym wzroście ekspresji cytokin przeciwzapalnych tj. *TGF- β 1*
- Warunki fizjologicznej normoksji (5% O₂) dodatkowo wywołały istotny wzrost ekspresji neurotrofiny *BDNF*

Badania in vivo:

- Wyznaczono najmniejszą liczbę komórek niezbędną do otrzymania wyraźnego sygnału w badaniach z wykorzystaniem rezonansu magnetycznego. Za optymalną liczbę komórek podawanych do zwierząt uznano 5x10⁵ komórek
- Sygnał generowany przez komórki WJ-MSK zaobserwowano w miejscu podania (prążkowie) po 24 godz. od transplantacji do mózgu. W kolejnych punktach czasowych – 7, 14, 21 dni od przeszczepu komórki również można było zaobserwować w miejscu wcześniejszego uszkodzenia. Nie

zaobserwowano migracji komórek do innych struktur mózgu, poza prążkowiem, które uległo wcześniejszemu cytotoksycznemu uszkodzeniu

- Zaobserwowano istotne zahamowanie uszkodzenia mózgu w następstwie podania komórek WJ-MSC. Dodatkowo, podanie komórek w skafoldach przyczyniło się ostatecznie do zmniejszenia uszkodzenia mózgu w większym stopniu niż w przypadku przeszczepu komórek w soli fizjologicznej
- Analiza obrazowania zależnego od dyfuzji (DWI) po podaniu komórek WJ-MSC w soli fizjologicznej i skafoldach LP oraz FB wykazała detekcję sygnału w miejscu lezji, którego nie odnotowano w grupach sham oraz po uszkodzeniu ogniskowym. Sygnał obserwowano po 24 godz., 7, 14 oraz 21 dniach od przeszczepu
- W następstwie indukowanego iniekcją ouabainy uszkodzenia mózgu zaobserwowano zwiększoną ekspresję *BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*, *TGF- β 1*, *IL-6* oraz *IL-1 β* w porównaniu do kontroli (prążkowie zwierząt niepoddanych uszkodzeniu) we wszystkich analizowanych punktach czasowych – po 24 godz., 7, 14 i 21 dniach od powstałego urazu
- W wyniku podania komórek WJ-MSC do uszkodzonego mózgu szczura zaobserwowano wzrost ekspresji szczurzych markerów: *BDNF*, *GDNF*, *VEGF-A*, *TGF- β 1* w porównaniu do poziomu ekspresji obserwowanego w uszkodzonym prążkowie, gdzie nie zostały podane komórki. Najwyższy wzrost analizowanych genów zaobserwowano w przypadku podania komórek, które były hodowane w warunkach fizjologicznej normoksji, a następnie przeszczepione w skafoldach LP
- W następstwie podania komórek WJ-MSC do uszkodzonego prążkowie szczura odnotowano spadek ekspresji *IL-6*, niezależnie od sposobu podania komórek oraz warunków tlenowych, w jakich były hodowane WJ-MSC przed przeszczepem
- Po podaniu komórek WJ-MSC do uszkodzonego prążkowie szczura zaobserwowano spadek ekspresji prozapalnej *IL-1 β* w porównaniu do poziomu ekspresji obserwowanego w grupie kontrolnej (OUA), głównie po podaniu komórek hodowanych w warunkach fizjologicznej normoksji, a następnie przeszczepionych w skafoldach LP

- Po uszkodzeniu ogniskowym zaobserwowano wzrost stężenia BDNF, TGF- β 1, IL-6, IL-1 β w płynie mózgowo-rdzeniowym szczurów w porównaniu do kontroli
- Po przeszczepie komórek WJ-MSC obserwowano wzrost stężenia BDNF, GDNF, TGF- β 1 w płynie mózgowo-rdzeniowym szczurów w porównaniu do stężenia obserwowanego po uszkodzeniu ogniskowym. Obserwowane stężenie utrzymywało się na wyższym poziomie po podaniu WJ-MSC w skafoldach w porównaniu do 2D. Zaobserwowano jednocześnie zmniejszone stężenie cytokin IL-6 oraz IL-1 β w płynie mózgowo-rdzeniowym po podaniu komórek WJ-MSC w porównaniu do stężenia u szczurów po OUA bez podania komórek

Wnioski

- WJ-MSC produkują czynniki immunomodulujące, a ich ekspresja może być modyfikowana warunkami mikrośrodowiska hodowli komórkowej
- Warunki hodowli 3D oraz 5% O₂ zwiększają działanie neuroprotektoryjne WJ-MSC i mogą wpływać na ich potencjalne właściwości regeneracyjne
- Wstępne prekondycjonowanie komórek przed przeszczepem jest wskazane dla zapewnienia warunków biomimetycznych, zgodnych z niszą endogenną
- Optymalizacja i standaryzacja warunków w celu otrzymania komórek kompetentnych terapeutycznie powinna obejmować hodowlę trójwymiarową i dostosowanie poziomu tlenu do normoksji fizjologicznej (5% O₂)
- WJ-MSC mogą wpływać immunomodulacyjnie na reakcję zapalną uszkodzonego mózgu, stymulując tym samym proces regeneracji
- Hydrożelowe rusztowania wykonane z lizatu płytkowego i fibrynogenu stanowią obiecujący materiał jako nośniki dla komórek macierzystych do potencjalnego wykorzystania w terapii komórkowej chorób układu nerwowego
- Zastosowanie warunków fizjologicznej normoksji oraz hydrożelowych rusztowań jako nośników do przeszczepu chroniących komórki przed reakcją układu odpornościowego biorcy wydają się najbardziej właściwym podejściem terapeutycznym
- Ostateczne właściwości terapeutyczne przeszczepionych komórek zależą od ich wstępnego prekondycjonowania przed transplantacją oraz działania czynników prozapalnych wydzielanych przez mikrośrodowisko uszkodzonej tkanki
- Czynniki prozapalne wydzielane przez mikrośrodowisko uszkodzonej tkanki w obecności przeszczepionych WJ-MSC wpływają pozytywnie na proces regeneracji poprzez stymulację podanych komórek do produkcji czynników neuroprotektoryjnych i proregeneracyjnych

Bibliografia

- Abbaszadeh H, Ghorbani F, Derakhshani M, Movassaghpour AA, Yousefi M, Talebi M, Shamsasenjan K. *Regenerative potential of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: A new horizon of stem cell therapy*. J Cell Physiol. 2020;235(12):9230-9240. doi: 10.1002/jcp.29810
- Abdulrazzak H, Moschidou D, Jones G, Guillot PV. *Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues*. J R Soc Interface. 2010;7(6): 689-706. doi: 10.1098/rsif.2010.0347.focus
- Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. *Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications*. Tissue Eng Part B Rev. 2008;14(2):199-215. doi: 10.1089/ten.teb.2007.0435
- Allen AB, Butts EB, Copland IB, Stevens HY, Guldberg RE. *Human platelet lysate supplementation of mesenchymal stromal cell delivery: issues of xenogenicity and species variability*. J. Tissue Eng. Regen. Med. 2017;11(10):2876–2884. doi: 10.1002/term.2191
- Altaie A, Owston H, Jones E. *Use of platelet lysate for bone regeneration—Are we ready for clinical translation?* World J. Stem Cells. 2016;8(2):47–55. doi: 10.4252/wjsc.v8.i2.47
- Assis-Ribas T, Forni MF, Winnischofer SMB, Sogayar MC, Trombetta-Lima M. *Extracellular matrix dynamics during mesenchymal stem cells differentiation*. Dev Biol. 2018;437(2):63-74. doi: 10.1016/j.ydbio.2018.03.002
- Astori G, Amati E, Bambi F, Bernardi M, Chiericato K, Schäfer R, Sella S, Rodeghiero F. *Platelet lysate as a substitute for animal serum for the ex-vivo expansion of mesenchymal stem/stromal cells: present and future*. Stem Cell Res Ther. 2016;7(1):93. doi: 10.1186/s13287-016-0352-x
- Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, Musilkova J, Pajorova J, Slepicka P, Kasalkova NS, Svorcik V, Kolska Z, Motarjemi H, Molitor M. *Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells - a review*. Biotechnol Adv. 2018;36(4):1111-1126. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.03.011
- Bagher Z, Azami M, Ebrahimi-Barough S, Mirzadeh H, Solouk A, Soleimani M, Ai J, Nourani MR, Joghataei MT. *Differentiation of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells into Motor Neuron-Like Cells on Three-Dimensional Collagen-Grafted Nanofibers*. Mol Neurobiol. 2016;53(4):2397-2408. doi: 10.1007/s12035-015-9199-x
- Barro L, Burnouf PA, Chou ML, Nebie O, Wu YW, Chen MS, Radosevic M, Knutson F, Burnouf T. *Human platelet lysates for human cell propagation*. Platelets. 2021;32(2):152-162. doi: 10.1080/09537104.2020.1849602
- Bensaïd W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H. *A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation*. Biomaterials. 2003;24(14):2497-2502. doi: 10.1016/s0142-9612(02)00618-x
- Betancourt AM. *New Cell-Based Therapy Paradigm: Induction of Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells into Pro-Inflammatory MSC1 and Anti-inflammatory MSC2 Phenotypes*. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2013;130:163-197. doi: 10.1007/10_2012_141
- Bianco P, Barker R, Brüstle O, Cattaneo E, Clevers H, Daley GQ, De Luca M, Goldstein L, Lindvall O, Mummery C, Robey PG, Sattler de Sousa E Brito C, Smith A. *Regulation of stem cell therapies under attack in Europe: for whom the bell tolls*. EMBO J. 2013;32(11):1489–1495. doi: 10.1038/emboj.2013.114

- Bieback K. *Platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures*. *Transfus Med Hemother*. 2013;40(5):326-335. doi: 10.1159/000354061
- Bonaventura A, Liberale L, Vecchié A, Casula M, Carbone F, Dallegri F, Montecucco F. *Update on Inflammatory Biomarkers and Treatments in Ischemic Stroke*. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):1967. doi: 10.3390/ijms17121967
- Boregowda SV, Krishnappa V, Chambers JW, Lograsso PV, Lai WT, Ortiz LA, Phinney DG. *Atmospheric oxygen inhibits growth and differentiation of marrow-derived mouse mesenchymal stem cells via a p53-dependent mechanism: implications for long-term culture expansion*. *Stem Cells*. 2012;30(5):975–987. doi: 10.1002/stem.1069
- Bron JL, Vonk LA, Smit TH, Koenderink GH. *Engineering alginate for intervertebral disc repair*. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater*. 2011;4(7):1196–1205. doi: 10.1016/j.jmbbm.2011.04.002
- Brouns R, De Deyn PP. *The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke*. *Clin Neurol Neurosurg*. 2009;111(6):483-495. doi: 10.1016/j.clineuro.2009.04.001
- Buzanska L, Zychowicz M, Kinsner-Ovaskainen A. *Bioengineering of the Human Neural Stem Cell Niche: A Regulatory Environment for Cell Fate and Potential Target for Neurotoxicity*. *Results Probl Cell Differ*. 2018;66:207-230. doi: 10.1007/978-3-319-93485-3_9
- Buzanska L, Zychowicz M, Ruiz A, Ceriotti L, Coecke S, Rauscher H, Sobanski T, Whelan M, Domanska-Janik K, Colpo P, Rossi F. *Neural stem cells from human cord blood on bioengineered surfaces – novel approach to multiparameter bio-tests*. *Toxicology*. 2010;270(1):35–42. doi: 10.1016/j.tox.2009.06.005
- Buzanska, L, Zychowicz, M, Sarnowska, A, Domanska-Janik, K. *Bioengineering of neural stem cell niche*. *Postepy. Biochem*. 2013;59(2):175–186
- Capcha JMC, Rodrigues CE, Moreira RS, Silveira MD, Dourado P, Dos Santos F, Irigoyen MC, Jensen L, Garnica MR, Noronha IL, Andrade L, Gomes SA. *Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells attenuate sepsis-induced organ injury partially via cholinergic anti-inflammatory pathway activation*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2020;318(1):135-147. doi: 10.1152/ajpregu.00098.2018
- Chang CP, Chio CC, Cheong CU, Chao CM, Cheng BC, Lin MT. *Hypoxic preconditioning enhances the therapeutic potential of the secretome from cultured human mesenchymal stem cells in experimental traumatic brain injury*. *Clin Sci (Lond)*. 2013;124(3):165-176. doi: 10.1042/CS20120226
- Chapman KZ, Ge R, Monni E, Tatarishvili J, Ahlenius H, Arvidsson A, Ekdahl CT, Lindvall O, Kokaia Z. *Inflammation without neuronal death triggers striatal neurogenesis comparable to stroke*. *Neurobiol Dis*. 2015;83:1-15. doi: 10.1016/j.nbd.2015.08.013
- Charbord P. *Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts*. *Hum Gene Ther*. 2010;21(9):1045-1056. doi: 10.1089/hum.2010.115
- Chatzistamatiou TK, Papassavas AC, Michalopoulos E, Gamaloutsos C, Mallis P, Gontika I, Panagouli E, Koussoulakos SL, Stavropoulos-Giokas C. *Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve Wharton's jelly's mesenchymal stem cell (MSC) properties: an MSC banking protocol validation*

for the Hellenic Cord Blood Bank. *Transfusion*. 2014;54(12):3108–3120. doi: 10.1111/trf.12743

- Chen B, Sun HH, Wang HG, Kong H, Chen FM, Yu Q. *The effects of human platelet lysate on dental pulp stem cells derived from impacted human third molars*. *Biomaterials*. 2012;33(20):5023–5035. doi: 10.1016/j.bioma.terials.2012.03.057
- Chen MS, Wang TJ, Lin HC, Burnouf T. *Four types of human platelet lysate, including one virally inactivated by solvent-detergent, can be used to propagate Wharton jelly mesenchymal stromal cells*. *N Biotechnol*. 2019;49:151-160. doi: 10.1016/j.nbt.2018.11.003
- Chen Y, Shu Z, Qian K, Wang J, Zhu H. *Harnessing the properties of biomaterial to enhance the immunomodulation of mesenchymal stem cells*. *Tissue Eng. Part B Rev*. 2019;25(6):492–499. doi: 10.1089/ten.TEB.2019.0131
- Christodoulou I, Kolisis FN, Papaevangelidou D, Zoumpourlis V. *Comparative Evaluation of Human Mesenchymal Stem Cells of Fetal (Wharton's Jelly) and Adult (Adipose Tissue) Origin during Prolonged In Vitro Expansion: Considerations for Cytotherapy*. *Stem Cells Int*. 2013;2013:246134. doi: 10.1155/2013/246134
- Ciardulli MC, Lovecchio J, Scala P, Lamparelli EP, Dale TP, Giudice V, Giordano E, Selleri C, Forsyth NR, Maffulli N, Della Porta G. *3D Biomimetic Scaffold for Growth Factor Controlled Delivery: An In-Vitro Study of Tenogenic Events on Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells*. *Pharmaceutics*. 2021;13(9):1448. doi: 10.3390/pharmaceutics13091448
- Ciardulli MC, Marino L, Lovecchio J, Giordano E, Forsyth NR, Selleri C, Maffulli N, Porta GD. *Tendon and Cytokine Marker Expression by Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in a Hyaluronate/Poly-Lactic-Co-Glycolic Acid (PLGA)/Fibrin Three-Dimensional (3D) Scaffold*. *Cells*. 2020;9(5):1268. doi: 10.3390/cells9051268
- Clausen BH, Lambertsen KL, Babcock AA, Holm TH, Dagnaes-Hansen F, Finsen B. *Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are expressed by different subsets of microglia and macrophages after ischemic stroke in mice*. *J Neuroinflammation*. 2008;5:46. doi: 10.1186/1742-2094-5-46
- Conconi MT, Di Liddo R, Tommasini M, Calore C, Parnigotto PP. *Phenotype and Differentiation Potential of Stromal Populations Obtained from Various Zones of Human Umbilical Cord: An Overview*. *The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal*. 2011;4:6-20. doi: 10.2174/1875043501104010006
- Cruz FF, Rocco PR. *Hypoxic preconditioning enhances mesenchymal stromal cell lung repair capacity*. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(1):130. doi: 10.1186/s13287-015-0120-3
- Darsalia V, Kallur T, Kokaia Z. *Survival, migration and neuronal differentiation of human fetal striatal and cortical neural stem cells grafted in stroke-damaged rat striatum*. *Eur J Neurosci*. 2007;26(3):605-614. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05702.x
- Datta A, Sarmah D, Mounica L, Kaur H, Kesharwani R, Verma G, Veeresh P, Kotian V, Kalia K, Borah A, Wang X, Dave KR, Yavagal DR, Bhattacharya P. *Cell Death Pathways in Ischemic Stroke and Targeted Pharmacotherapy*. *Transl Stroke Res*. 2020;11(6):1185-1202. doi: 10.1007/s12975-020-00806-z

- de la Puente P, Ludeña D. *Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering*. Exp Cell Res. 2014;322(1):1-11. doi: 10.1016/j.yexcr.2013.12.017
- Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV. *Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue engineering*. Biomaterials. 2005;26:5983–5990. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.03.016
- Di Mattia M, Mauro A, Citeroni MR, Dufrusine B, Peserico A, Russo V, Berardinelli P, Dainese E, Cimini A, Barboni B. *Insight into Hypoxia Stemness Control*. Cells. 2021;10(8):2161. doi: 10.3390/cells10082161
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM. *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy. 2006;8(4):315-317. doi: 10.1080/14653240600855905
- Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense JR, Begot L, Holy X, Lataillade JJ. *Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications*. J Cell Physiol. 2005;205(2):228-236. doi: 10.1002/jcp.20391
- Drela K, Lech W, Figiel-Dabrowska A, Zychowicz M, Mikula M, Sarnowska A, Domanska-Janik K. *Enhanced neuro-therapeutic potential of Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells culture*. Cytotherapy. 2016;18(4):497-509. doi: 10.1016/j.jcyt.2016.01.006
- Drela K, Sarnowska A, Siedlecka P, Szablowska-Gadomska I, Wielgos M, Jurga M, Lukomska B, Domanska-Janik K. *Low oxygen atmosphere facilitates proliferation and maintains undifferentiated state of umbilical cord mesenchymal stem cells in an hypoxia inducible factor-dependent manner*. Cytotherapy. 2014;16(7):881-892. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.02.009
- Drela K, Siedlecka P, Sarnowska A, Domanska-Janik K. *Human mesenchymal stem cells in the treatment of neurological diseases*. Acta Neurobiol Exp. 2013;73:38–56.
- Drela K, Stanaszek L, Nowakowski A, Kuczynska Z, Lukomska B. *Experimental Strategies of Mesenchymal Stem Cell Propagation: Adverse Events and Potential Risk of Functional Changes*. Stem Cells Int. 2019;2019:7012692. doi: 10.1155/2019/7012692
- Dubois-Dauphin M, Julien S. *Stem cell-derived neurons grafted in the striatum are expelled out of the brain after chronic cortical stroke*. Stroke. 2010;41(8):1807-1814. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.578427
- Duong H, Wu B, Tawil B. *Modulation of 3D fibrin matrix stiffness by intrinsic fibrinogen-thrombin compositions and by extrinsic cellular activity*. Tissue Eng Part A. 2009;15(7):1865-1876. doi: 10.1089/ten.tea.2008.0319
- Durukan A, Tatlisumak T. *Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia*. Pharmacol Biochem Behav. 2007;87(1):179-197. doi: 10.1016/j.pbb.2007.04.015
- Ebhodaghe SO. *Natural Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering Applications*. J Biomater Sci Polym Ed. 2021;32(16):2144-2194. doi: 10.1080/09205063.2021.1958185

- Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. *Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification*. Cell. 2006;126(4): 677-689. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.044
- Eyileten C, Sharif L, Wicik Z, Jakubik D, Jarosz-Popek J, Soplinska A, Postula M, Czlonkowska A, Kaplon-Cieslicka A, Mirowska-Guzel D. *The Relation of the Brain-Derived Neurotrophic Factor with MicroRNAs in Neurodegenerative Diseases and Ischemic Stroke*. Mol Neurobiol. 2021;58(1):329-347. doi: 10.1007/s12035-020-02101-2
- Fedorov A, Beichel R, Kalpathy-Cramer J, Finet J, Fillion-Robin JC, Pujol S, Bauer C, Jennings D, Fennessy F, Sonka M, Buatti J, Aylward S, Miller JV, Pieper S, Kikinis R. *3D Slicer as an image computing platform for the Quantitative Imaging Network*. Magn Reson Imaging. 2012;30(9):1323-1341. doi: 10.1016/j.mri.2012.05.001
- Ferreira AM, Gentile P, Chiono V, Ciardelli G. *Collagen for bone tissue regeneration*. Acta Biomater. 2012;8(9):3191-3200. doi: 10.1016/j.actbio.2012.06.014
- Ferry B, Gervasoni D, Vogt C. *Stereotaxic Approach of a Target Structure*. In: *Stereotaxic Neurosurgery in Laboratory Rodent*. Springer. 2014:1-18. doi:10.1007/978-2-8178-0472-9_1
- Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. *Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research*. Drug Des Devel Ther. 2015;9:3445-3454. doi: 10.2147/DDDT.S56071
- Francis KR, Wei L. *Human embryonic stem cell neural differentiation and enhanced cell survival promoted by hypoxic preconditioning*. Cell Death Dis. 2010;1(2):22. doi: 10.1038/cddis.2009.22
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. *The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells*. Cell Tissue Kinet. 1970;3(4):393-403. doi: 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x
- Griffioen AW, Bischoff J. *Oxygen sensing decoded: a Nobel concept in biology*. Angiogenesis. 2019;22(4):471-472. doi: 10.1007/s10456-019-09692-y
- Gryglewski A, Majcher P, Szczepanik M. *Immunologiczne aspekty urazu*. Postepy Hig Med Dosw. (online). 2006;60:192-200
- Guiotto M, Raffoul W, Hart AM, Riehle MO, di Summa PG. *Human platelet lysate to substitute fetal bovine serum in hMSC expansion for translational applications: a systematic review*. J Transl Med. 2020;18(1):351. doi: 10.1186/s12967-020-02489-4
- Harrell CR, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. *Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome*. Cells. 2019;8(5):467. doi: 10.3390/cells8050467
- Hatakeyama M, Ninomiya I, Otsu Y, Omae K, Kimura Y, Onodera O, Fukushima M, Shimohata T, Kanazawa M. *Cell Therapies under Clinical Trials and Polarized Cell Therapies in Pre-Clinical Studies to Treat Ischemic Stroke and Neurological Diseases: A Literature Review*. Int J Mol Sci. 2020;21(17):6194. doi: 10.3390/ijms21176194
- Hosseini SM, Vasaghi A, Nakhlarparvar N, Roshanravan R, Talaei-Khozani T, Razi Z. *Differentiation of Wharton's jelly mesenchymal stem cells into neurons in alginate scaffold*. Neural Regen Res. 2015;10(8):1312-1316. doi: 10.4103/1673-5374.162768

- Hu C, Li L. *Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo*. J Cell Mol Med. 2018;22(3):1428-1442. doi: 10.1111/jcmm.13492
- Huang C, Bao L, Lin T, Lu Y, Wu Y. *Proliferation and odontogenic differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells and human dental pulp cells co-cultured in hydrogel*. Arch Oral Biol. 2020;109:104582. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.104582
- Huang G, Li F, Zhao X, Ma Y, Li Y, Lin M, Jin G, Lu TJ, Genin GM, Xu F. *Functional and Biomimetic Materials for Engineering of the Three-Dimensional Cell Microenvironment*. Chem Rev. 2017;117(20):12764-12850. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00094
- Hung KC, Tseng CS, Hsu SH. *Synthesis and 3D printing of biodegradable polyurethane elastomer by a water-based process for cartilage tissue engineering applications*. Adv. Healthc. Mater. 2014;3:1578–1587. doi: 10.1002/adhm.201400018
- Hur JW, Kim MS, Oh SY, Kang HY, Bae J, Kim H, Lee H, Lee SW, Park DH. *Label-Free Quantitative Proteome Profiling of Cerebrospinal Fluid from a Rat Stroke Model with Stem Cell Therapy*. Cell Transplant. 2021;30:9636897211023474. doi: 10.1177/09636897211023474
- Incontri Abraham D, Gonzales M, Ibarra A, Borlongan CV. *Stand alone or join forces? Stem cell therapy for stroke*. Expert Opin Biol Ther. 2019;19(1):25-33. doi: 10.1080/14712598.2019.1551872
- Ivanovic Z. *Hypoxia or in situ normoxia: the stem cell paradigm*. J. Cell. Physiol. 2009;219(2):271–275. doi: 10.1002/jcp.21690
- Ivanovic Z. *Stem cell evolutionary paradigm and cell engineering*. Transfus Clin Biol. 2017;24(3):251-255. doi: 10.1016/j.traccli.2017.05.004
- Jafar H, Abuarqoub D, Ababneh N, Hasan M, Al-Sotari S, Aslam N, Kailani M, Ammouh M, Shraideh Z, Awidi A. *hPL promotes osteogenic differentiation of stem cells in 3D scaffolds*. PLoS One. 2019;14(5):e0215667. doi: 10.1371/journal.pone.0215667
- Janowski M, Gornicka-Pawlak E, Kozłowska H, Domanska-Janik K, Gielecki J, Lukomska B. *Structural and functional characteristic of a model for deep-seated lacunar infarct in rats*. J Neurol Sci. 2008;273(1-2):40-48. doi: 10.1016/j.jns.2008.06.019
- Jeschke MG, Gauglitz GG, Phan TT, Herndon DN, Kita K. *Umbilical Cord Lining Membrane and Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: The Similarities and Differences*. The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal. 2011;4: 21-27. doi: 10.2174/1875043501104010021
- Jin R, Liu L, Zhang S, Nanda A, Li G. *Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke*. J Cardiovasc Transl Res. 2013;6(5):834-851. doi: 10.1007/s12265-013-9508-6
- Jin R, Yang G, Li G. *Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells*. J Leukoc Biol. 2010;87(5):779-789. doi: 10.1189/jlb.1109766
- Jooybar E, Abdekhodaie MJ, Alvi M, Mousavi A, Karperien M, Dijkstra PJ. *An injectable platelet lysate-hyaluronic acid hydrogel supports cellular activities and induces chondrogenesis of encapsulated mesenchymal stem cells*. Acta Biomater. 2019;83:233-244. doi: 10.1016/j.actbio.2018.10.031

- Kawabori M, Shichinohe H, Kuroda S, Houkin K. *Clinical Trials of Stem Cell Therapy for Cerebral Ischemic Stroke*. Int J Mol Sci. 2020;21(19):7380. doi: 10.3390/ijms21197380
- Kenne L, Gohil S, Nilsson EM, Karlsson A, Ericsson D, Helander Kenne A, Nord LI. *Modification and cross-linking parameters in hyaluronic acid hydrogels--definitions and analytical methods*. Carbohydr Polym. 2013;91(1):410-418. doi: 10.1016/j.carbpol.2012.08.066
- Kim DS, Ko YJ, Lee MW, Park HJ, Park YJ, Kim DI, Sung KW, Koo HH, Yoo KH. *Effect of low oxygen tension on the biological characteristics of human bone marrow mesenchymal stem cells*. Cell Stress Chaperones. 2016;21(6):1089-1099. doi: 10.1007/s12192-016-0733-1
- Kim H, Bae C, Kook YM, Koh WG, Lee K, Park MH. *Mesenchymal stem cell 3D encapsulation technologies for biomimetic microenvironment in tissue regeneration*. Stem Cell Res Ther. 2019;10(1):51. doi: 10.1186/s13287-018-1130-8
- Kolios G, Moodley Y. *Introduction to stem cells and regenerative medicine*. Respiration. 2013;85(1):3-10. doi: 10.1159/000345615
- Kondiah PJ, Choonara YE, Kondiah PP, Marimuthu T, Kumar P, du Toit LC, Pillay V. *A Review of Injectable Polymeric Hydrogel Systems for Application in Bone Tissue Engineering*. Molecules. 2016;21(11):1580. doi: 10.3390/molecules21111580
- Kosinski M, Figiel-Dabrowska A, Lech W, Wieprzowski L, Strzalkowski R, Strzemecki D, Cheda L, Lenart J, Domanska-Janik K, Sarnowska A. *Bone Defect Repair Using a Bone Substitute Supported by Mesenchymal Stem Cells Derived from the Umbilical Cord*. Stem Cells Int. 2020;2020:1321283. doi: 10.1155/2020/1321283
- Kruminis-Kaszkiel E, Osowski A, Bejer-Olenska E, Dziekonski M, Wojtkiewicz J. *Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly Towards Neural Stem Cells Using A Feasible and Repeatable Protocol*. Cells. 2020;9(3):739. doi: 10.3390/cells9030739
- Kurtzeborn K, Cebrian C, Kuure S. *Regulation of Renal Differentiation by Trophic Factors*. Front Physiol. 2018;9:1588. doi: 10.3389/fphys.2018.01588
- Kwak KA, Kwon HB, Lee JW, Park YS. *Current Perspectives Regarding Stem Cell-based Therapy for Ischemic Stroke*. Curr Pharm Des. 2018;24(28):3332-3340. doi: 10.2174/1381612824666180604111806
- Lambertsen KL, Biber K, Finsen B. *Inflammatory cytokines in experimental and human stroke*. J Cereb Blood Flow Metab. 2012;32(9):1677-1698. doi: 10.1038/jcbfm.2012.88
- Lan YW, Choo KB, Chen CM, Hung TH, Chen YB, Hsieh CH, Kuo HP, Chong KY. *Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells attenuate bleomycin-induced pulmonary fibrosis*. Stem Cell Res Ther. 2015;6(1):97. doi: 10.1186/s13287-015-0081-6
- Lech W, Figiel-Dabrowska A, Sarnowska A, Drela K, Obtulowicz P, Noszczyk BH, Buzanska L, Domanska-Janik K. *Phenotypic, Functional, and Safety Control at Preimplantation Phase of MSC-Based Therapy*. Stem Cells Int. 2016;2016:2514917. doi: 10.1155/2016/2514917
- Lech W, Sarnowska A, Kuczynska Z, Dabrowski F, Figiel-Dabrowska A, Domanska-Janik K, Buzanska L, Zychowicz M. *Biomimetic microenvironmental preconditioning enhance neuroprotective properties of*

human mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly (WJ-MSCs). Sci Rep. 2020;10(1):16946. doi: 10.1038/s41598-020-74066-0

- Lee CC, Wu CY, Yang HY. *Discoveries of how cells sense oxygen win the 2019 Nobel Prize in Physiology or medicine*. Biomed J. 2020;43(5):434-437. doi: 10.1016/j.bj.2020.05.019
- Li D, Zhou J, Zhang M, Ma Y, Yang Y, Han X, Wang X. *Long-term delivery of alendronate through an injectable tetra-PEG hydrogel to promote osteoporosis therapy*. Biomater Sci. 2020;8(11):3138-3146. doi: 10.1039/d0bm00376j
- Li H, Shen S, Fu H, Wang Z, Li X, Sui X, Yuan M, Liu S, Wang G, Guo Q. *Immunomodulatory Functions of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Engineering*. Stem Cells Int. 2019;2019:9671206. doi: 10.1155/2019/9671206
- Li J, Zhang D, Guo S, Zhao C, Wang L, Ma S, Guan F, Yao M. *Dual-enzymatically cross-linked gelatin hydrogel promotes neural differentiation and neurotrophin secretion of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of moderate traumatic brain injury*. Int J Biol Macromol. 2021;187:200-213. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.07.111
- Li J, Zhang Q, Wang W, Lin F, Wang S, Zhao J. *Mesenchymal stem cell therapy for ischemic stroke: A look into treatment mechanism and therapeutic potential*. J Neurol. 2021;268(11):4095-4107. doi: 10.1007/s00415-020-10138-5
- Li Y, Dong Y, Ran Y, Zhang Y, Wu B, Xie J, Cao Y, Mo M, Li S, Deng H, Hao W, Yu S, Wu Y. *Three-dimensional cultured mesenchymal stem cells enhance repair of ischemic stroke through inhibition of microglia*. Stem Cell Res Ther. 2021;12(1):358. doi: 10.1186/s13287-021-02416-4
- Li Y, Zhang J. *Animal models of stroke*. Animal Model Exp Med. 2021;4(3):204-219. doi: 10.1002/ame2.12179
- Liao LL, Ruszymah BHI, Ng MH, Law JX. *Characteristics and clinical applications of Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells*. Curr Res Transl Med. 2020;68(1):5-16. doi: 10.1016/j.retram.2019.09.001
- Litvinov RI, Pieters M, de Lange-Loots Z, Weisel JW. *Fibrinogen and Fibrin*. Subcell Biochem. 2021;96:471-501. doi: 10.1007/978-3-030-58971-4_15
- Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, George J, Young HA, Liu G. *Cytokines: From Clinical Significance to Quantification*. Adv Sci (Weinh). 2021;8(15):e2004433. doi: 10.1002/advs.202004433
- Lu P, Graham L, Wang Y, Wu D, Tuszynski, M. *Promotion of survival and differentiation of neural stem cells with fibrin and growth factor cocktails after severe spinal cord injury*. J. Vis. Exp. 2014;89:e50641. doi: 10.3791/50641
- Lv H, Li L, Sun M, Zhang Y, Chen L, Rong Y, Li Y. *Mechanism of regulation of stem cell differentiation by matrix stiffness*. Stem Cell Res Ther. 2015;6(1):103. doi: 10.1186/s13287-015-0083-4
- Lynch CR, Kondiah PPD, Choonara YE. *Advanced Strategies for Tissue Engineering in Regenerative Medicine: A Biofabrication and Biopolymer Perspective*. Molecules. 2021;26(9):2518. doi: 10.3390/molecules26092518
- Maacha S, Sidahmed H, Jacob S, Gentilcore G, Calzone R, Grivel J-C, Cugno C. *Paracrine mechanisms of mesenchymal stromal cells in angiogenesis*. Stem Cells Int. 2020;2020:4356359. doi: 10.1155/2020/4356359
- Madl CM, Heilshorn SC. *Engineering Hydrogel Microenvironments to Recapitulate the Stem Cell Niche*. Annu Rev Biomed Eng. 2018;20:21-47. doi: 10.1146/annurev-bioeng-062117-120954

- Madl CM, LeSavage BL, Dewi RE, Lampe KJ, Heilshorn SC. *Matrix Remodeling Enhances the Differentiation Capacity of Neural Progenitor Cells in 3D Hydrogels*. Adv Sci (Weinh). 2019;6(4):1801716. doi: 10.1002/advs.201801716
- Maida CD, Norrito RL, Daidone M, Tuttolomondo A, Pinto A. *Neuroinflammatory Mechanisms in Ischemic Stroke: Focus on Cardioembolic Stroke, Background, and Therapeutic Approaches*. Int J Mol Sci. 2020;21(18):6454. doi: 10.3390/ijms21186454
- Mallis P, Stavropoulos-Giokas C, Michalopoulos E. *Introduction to the Special Issue on Stem Cell and Biologic Scaffold Engineering*. Bioengineering (Basel). 2019;6(3):72. doi: 10.3390/bioengineering6030072
- Mangin G, Kubis N. *Cell Therapy for Ischemic Stroke: How to Turn a Promising Preclinical Research into a Successful Clinical Story*. Stem Cell Rev Rep. 2019;15(2):176-193. doi: 10.1007/s12015-018-9864-3
- Martín-Martín Y, Fernández-García L, Sanchez-Rebato MH, Marí-Buyé N, Rojo FJ, Pérez-Rigueiro J, Ramos M, Guinea GV, Panetsos F, González-Nieto D. *Evaluation of Neurosecretome from Mesenchymal Stem Cells Encapsulated in Silk Fibroin Hydrogels*. Sci Rep. 2019;9(1):8801. doi: 10.1038/s41598-019-45238-4
- Marusina AI, Merleev AA, Luna JI, Olney L, Haigh NE, Yoon D, Guo C, Ovadia EM, Shimoda M, Luxardi G, Boddu S, Lal NN, Takada Y, Lam KS, Liu R, Isseroff RR, Le S, Nolta JA, Kloxin AM, Maverakis E. *Tunable hydrogels for mesenchymal stem cell delivery: Integrin-induced transcriptome alterations and hydrogel optimization for human wound healing*. Stem Cells. 2020;38(2):231-245. doi: 10.1002/stem.3105
- Matri M, Shah Z, McLaughlin T, Greene CJ, Baum L, Suzuki G, Lee T. *Activation of Toll-like receptor 3 amplifies mesenchymal stem cell trophic factors and enhances therapeutic potency*. Am J Physiol Cell Physiol. 2012;303(10):1021-1033. doi: 10.1152/ajpcell.00191.2012
- Merkhan MM, Shephard MT, Forsyth NR. *Physoxia alters human mesenchymal stem cell secretome*. J Tissue Eng. 2021;12:20417314211056132. doi: 10.1177/20417314211056132
- Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, Helwig B, Beerensrauch M, Abou-Easa K, Hildreth T, Troyer D, Medicetty S. *Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia*. Stem Cells. 2003;21(1):50-60. doi: 10.1634/stemcells.21-1-50
- Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. *Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche*. Cell Stem Cell. 2010;7(2):150-161. doi: 10.1016/j.stem.2010.07.007
- Moroz A, Bittencourt RA, Almeida RP, Felisbino SL, Deffune E. *Platelet lysate 3D scaffold supports mesenchymal stem cell chondrogenesis: an improved approach in cartilage tissue engineering*. Platelets. 2013;24(3):219-225. doi: 10.3109/09537104.2012.686255
- Mousavifard A, Najafabadi EP, Rahnama MA, Anbarlou A, Atashi A. *Elevated expression of stemness genes in adipose-derived mesenchymal stem cells cultured on fibrin scaffold*. J Biosci. 2020;45:81
- Muhammad S, Chaudhry SR, Kahlert UD, Niemelä M, Hänggi D. *Brain Immune Interactions-Novel Emerging Options to Treat Acute Ischemic Brain Injury*. Cells. 2021;10(9):2429. doi: 10.3390/cells10092429

- Murakami Y, Saito K, Hara A, Zhu Y, Sudo K, Niwa M, Fujii H, Wada H, Ishiguro H, Mori H, Seishima M. *Increases in tumor necrosis factor-alpha following transient global cerebral ischemia do not contribute to neuron death in mouse hippocampus*. J Neurochem. 2005;93(6):1616-1622. doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03163.x
- Musah S, Wrighton PJ, Zaltsman Y, Zhong X, Zorn S, Parlato MB, Hsiao C, Palecek SP, Chang Q, Murphy WL, Kiessling LL. *Substratum-induced differentiation of human pluripotent stem cells reveals the coactivator YAP is a potent regulator of neuronal specification*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(38):13805-13810. doi: 10.1073/pnas.1415330111
- Musial-Wysocka A, Kot M, Sulkowski M, Badyra B, Majka M. *Molecular and Functional Verification of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSCs) Pluripotency*. Int J Mol Sci. 2019;20(8):1807. doi: 10.3390/ijms20081807
- Nagamura-Inoue T, He H. *Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility*. World J Stem Cells. 2014;6(2):195-202. doi: 10.4252/wjsc.v6.i2.195
- Nekanti U, Dastidar S, Venugopal P, Totey S, Ta M. *Increased proliferation and analysis of differential gene expression in human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells under hypoxia*. Int J Biol Sci. 2010;6(5):499-512. doi: 10.7150/ijbs.6.499
- Noori A, Ashrafi SJ, Vaez-Ghaemi R, Hatamian-Zaremi A, Webster TJ. *A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering*. Int J Nanomedicine. 2017;12:4937-4961. doi: 10.2147/IJN.S124671
- Obradovic H, Krstic J, Trivanovic D, Mojsilovic S, Okic I, Kukulj T, Ilic V, Jaukovic A, Terzic M, Bugarski D. *Improving stemness and functional features of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of a human umbilical cord by mimicking the native, low oxygen stem cell niche*. Placenta. 2019;82:25-34. doi: 10.1016/j.placenta.2019.05.005
- Obtulowicz P, Lech W, Strojek L, Sarnowska A, Domanska-Janik K. *Induction of endothelial phenotype from Warton'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):715-727. doi: 10.3727/096368915X690369
- Okroj-Lubecka J, Szurowska E, Kozera G. *Neuroimaging of acute ischaemic stroke in clinical practice*. Forum Medycyny Rodzinnej. 2015;9(6):460-470
- Oppliger B, Joerger-Messerli MS, Simillion C, Mueller M, Surbek DV, Schoeberlein A. *Mesenchymal stromal cells from umbilical cord Wharton's jelly trigger oligodendroglial differentiation in neural progenitor cells through cell-to-cell contact*. Cytotherapy. 2017;19(7):829-838. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.03.075
- Oyen ML. *Mechanical characterisation of hydrogel materials*. International Materials Reviews. 2014;59(1):44-59. doi: 10.1179/1743280413Y.0000000022
- Pennings S, Liu KJ, Qian H. *The Stem Cell Niche: Interactions between Stem Cells and Their Environment*. Stem Cells Int. 2018;2018:4879379. doi: 10.1155/2018/4879379
- Pérez-Ilzarbe M, Díez-Campelo M, Aranda P, Tabera S, Lopez T, del Cañizo C, Merino J, Moreno C, Andreu EJ, Prósper F, Pérez-Simón JA. *Comparison*

of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy. Transfusion. 2009;49(9):1901-1910. doi: 10.1111/j.1537-2995.2009.02226.x

- Piękna M, Langa P, Kosikowska P, Trzonkowski P. *Komórki macierzyste i czynniki wzrostu w gojeniu ran.* Postepy Hig Med Dosw (online). 2015;69:874-885. doi:10.5604/17322693.1162989
- Pina S, Ribeiro VP, Marques CF, Maia FR, Silva TH, Reis RL, Oliveira JM. *Scaffolding Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications.* Materials (Basel). 2019;12(11):1824. doi: 10.3390/ma12111824
- Pirzad Jahromi G, Shabanzadeh Pirsaraei A, Sadr SS, Kaka G, Jafari M, Seidi S, Charish J. *Multipotent bone marrow stromal cell therapy promotes endogenous cell proliferation following ischemic stroke.* Clin Exp Pharmacol Physiol. 2015;42(11):1158-1167. doi: 10.1111/1440-1681.12466
- Posfai E, Schell JP, Janiszewski A, Rovic I, Murray A, Bradshaw B, Yamakawa T, Pardon T, El Bakkali M, Talon I, De Geest N, Kumar P, To SK, Petropoulos S, Jurisicova A, Pasque V, Lanner F, Rossant J. *Evaluating totipotency using criteria of increasing stringency.* Nat Cell Biol. 2021;23(1):49-60. doi: 10.1038/s41556-020-00609-2
- Prewitz M, Seib FP, Pompe T, Werner C. *Polymeric biomaterials for stem cell bioengineering.* Macromol Rapid Commun. 2012;33(17):1420-1431. doi: 10.1002/marc.201200382
- Robinson M, Douglas S, Michelle Willerth S. *Mechanically stable fibrin scaffolds promote viability and induce neurite outgrowth in neural aggregates derived from human induced pluripotent stem cells.* Sci Rep. 2017;7(1):6250. doi: 10.1038/s41598-017-06570-9
- Robinson ST, Douglas AM, Chadid T, Kuo K, Rajabalan A, Li H, Copland IB, Barker TH, Galipeau J, Brewster LP. *A novel platelet lysate hydrogel for endothelial cell and mesenchymal stem cell-directed neovascularization.* Acta Biomater. 2016;36:86-98. doi: 10.1016/j.actbio.2016.03.002
- Roura S, Gálvez-Montón C, Bayes-Genis A. *Fibrin, the preferred scaffold for cell transplantation after myocardial infarction? An old molecule with a new life.* J Tissue Eng Regen Med. 2017;11(8):2304-2313. doi: 10.1002/term.2129
- Saldaña L, Bensiamar F, Vallés G, Mancebo FJ, García-Rey E, Vilaboa N. *Immunoregulatory potential of mesenchymal stem cells following activation by macrophage-derived soluble factors.* Stem Cell Res Ther. 2019;10(1):58. doi: 10.1186/s13287-019-1156-6
- Sandri G, Bonferoni MC, Rossi S, Ferrari F, Mori M, Cervio M, Riva F, Liakos I, Athanassiou A, Saporito F, Marini L, Caramella C. *Platelet lysate embedded scaffolds for skin regeneration.* Expert Opin Drug Deliv. 2015;12(4):525-545. doi: 10.1517/17425247.2015.961421
- Santos SCNDS, Sigurjonsson ÓE, Custódio CA, Mano JFCDL. *Blood Plasma Derivatives for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Therapies.* Tissue Eng Part B Rev. 2018;24(6):454-462. doi: 10.1089/ten.TEB.2018.0008
- Sarnowska A, Jurga M, Buzanska L, Filipkowski RK, Duniec K, Domanska-Janik K. *Bilateral interaction between cord blood-derived human neural stem cells and organotypic rat hippocampal culture.* Stem Cells Dev. 2009;18(8):1191-2000. doi: 10.1089/scd.2008.0096

- Seshareddy K, Troyer D, Weiss ML. *Method to isolate mesenchymal-like cells from Wharton's Jelly of umbilical cord*. Methods Cell Biol. 2008;86:101-119. doi: 10.1016/S0091-679X(08)00006-X
- Shichinohe H, Kuroda S, Sugiyama T, Ito M, Kawabori M, Nishio M, Takeda Y, Koike T, Houkin K. *Biological Features of Human Bone Marrow Stromal Cells (hBMSC) Cultured with Animal Protein-Free Medium-Safety and Efficacy of Clinical Use for Neurotransplantation*. Transl Stroke Res. 2011;2(3):307-315. doi: 10.1007/s12975-011-0088-y
- Singh A, Yadav CB, Tabassum N, Bajpeyee AK, Verma V. *Stem cell niche: Dynamic neighbor of stem cells*. Eur J Cell Biol. 2019;98(2-4):65-73. doi: 10.1016/j.ejcb.2018.12.001
- Skardal A, Mack D, Atala A, Soker S. *Substrate elasticity controls cell proliferation, surface marker expression and motile phenotype in amniotic fluid-derived stem cells*. J. Mech. Behav. Biomed. Mater. 2013;17:307–316. doi: 10.1016/j.jmbbm.2012.10.001
- Sobolewski P. *Review of invasive endovascular methods of treatment in the patients with acute ischemic stroke*. Interdisciplinary Problems of Stroke. 2011;13(1–2):5–11
- Sodaei F, Shahmaei V. *Identification of penumbra in acute ischemic stroke using multimodal MR imaging analysis: A case report study*. Radiol Case Rep. 2020;15(10):2041-2046. doi: 10.1016/j.radcr.2020.07.066
- Soleimannejad M, Ebrahimi-Barough S, Soleimani M, Nadri S, Tavangar SM, Roohipoor R, Yazdankhah M, Bayat N, Riazi-Esfahani M, Ai J. *Fibrin gel as a scaffold for photoreceptor cells differentiation from conjunctiva mesenchymal stem cells in retina tissue engineering*. Artif Cells Nanomed Biotechnol. 2018;46(4):805-814. doi: 10.1080/21691401.2017.1345922
- Sommer CJ. *Ischemic stroke: experimental models and reality*. Acta Neuropathol. 2017;133(2):245-261. doi: 10.1007/s00401-017-1667-0
- Stabenfeldt SE, Gourley M, Krishnan L, Hoying JB, Barker TH. *Engineering fibrin polymers through engagement of alternative polymerization mechanisms*. Biomaterials. 2012;33(2):535-544. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.09.079
- Stanzone P, Tropepi D. *Drugs and clinical trials in neurodegenerative diseases*. Ann Ist Super Sanita. 2011;47(1):9-54. doi: 10.4415/ANN_11_01_11
- Subbiahanadar Chelladurai K, Selvan Christyraj JD, Rajagopalan K, Yesudhasan BV, Venkatachalam S, Mohan M, Chellathurai Vasantha N, Selvan Christyraj JRS. *Alternative to FBS in animal cell culture - An overview and future perspective*. Heliyon. 2021;7(8):e07686. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e07686
- Suda S, Nito C, Yokobori S, Sakamoto Y, Nakajima M, Sowa K, Obinata H, Sasaki K, Savitz SI, Kimura K. *Recent Advances in Cell-Based Therapies for Ischemic Stroke*. Int J Mol Sci. 2020;21(18):6718. doi: 10.3390/ijms21186718
- Sun J, Wei ZZ, Gu X, Zhang JY, Zhang Y, Li J, Wei L. *Intranasal delivery of hypoxia-preconditioned bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhanced regenerative effects after intracerebral hemorrhagic stroke in mice*. Exp Neurol. 2015;272:78-87. doi: 10.1016/j.expneurol.2015.03.011
- Szablowska-Gadomska I, Bużańska L, Małecki M. *Właściwości komórek macierzystych, regulacje prawne oraz zastosowanie w medycynie*. Postępy Hig Med Dosw (online). 2017;71:1216-1230

- Szablowska-Gadomska I, Sypecka J, Zayat V, Podobinska M, Pastwinska A, Pienkowska-Grela B, Buzanska L. *Treatment with small molecules is an important milestone towards the induction of pluripotency in neural stem cells derived from human cord blood*. Acta Neurobiol Exp (Wars). 2012;72(4):337-350
- Szewczyk P, Guziński M, Szaśiadek M. *Application of diffusion-weighted imaging (DWI) in differentiating acute and chronic ischaemic lesions – case report*. Interdisciplinary Problems of Stroke. 2008;10(1):49-54
- Taghizadeh RR, Cetrulo KJ, Cetrulo CL. *Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications*. Placenta. 2011;32:311-315. doi: 10.1016/j.placenta.2011.06.010
- Tan XD, Liu B, Jiang Y, Yu HJ, Li CQ. *Gadd45b mediates environmental enrichment-induced neurogenesis in the SVZ of rats following ischemia stroke via BDNF*. Neurosci Lett. 2021;745:135616. doi: 10.1016/j.neulet.2020.135616
- Tancharoen W, Aungsuchawan S, Pothacharoen P, Bumroongkit K, Puaninta C, Pangjaidee N, Narakornsak S, Markmee R, Laowanitwattana T, Thaojamnong C. *Human platelet lysate as an alternative to fetal bovine serum for culture and endothelial differentiation of human amniotic fluid mesenchymal stem cells*. Mol Med Rep. 2019;19(6):5123-5132. doi: 10.3892/mmr.2019.10182
- Tilwani RK, Bader DL, Chowdhury TT. *Biomechanical conditioning enhanced matrix synthesis in nucleus pulposus cells cultured in agarose constructs with TGF- β* . J. Funct. Biomater. 2012;3:23–36. doi: 10.3390/jfb3010023
- Timothy D. Sargeant, Arpan P. Desai, Saumya Banerjee, Atu Agawu, Joshua B. Stopek, *An in situ forming collagen–PEG hydrogel for tissue regeneration*. Acta Biomaterialia. 2012;8(1):124-132. doi: 10.1016/j.actbio.2011.07.028
- Tobin MK, Bonds JA, Minshall RD, Pelligrino DA, Testai FD, Lazarov O. *Neurogenesis and inflammation after ischemic stroke: what is known and where we go from here*. J Cereb Blood Flow Metab. 2014;34(10):1573-1584. doi: 10.1038/jcbfm.2014.130
- Tomecka E, Lech W, Zychowicz M, Sarnowska A, Murzyn M, Oldak T, Domanska-Janik K, Buzanska L, Rozwadowska N. *Assessment of the Neuroprotective and Stemness Properties of Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells under Variable (5% vs. 21%) Aerobic Conditions*. Cells. 2021;10(4):717. doi: 10.3390/cells10040717
- Tong CK, Vellasamy S, Tan BC, Abdullah M, Vidyadaran S, Seow HF, Ramasamy R. *Generation of mesenchymal stem cell from human umbilical cord tissue using a combination enzymatic and mechanical disassociation method*. Cell Biol Int. 2011;35(3):221-226. doi: 10.1042/CBI20100326
- Torres-Espín A, Hernández J, Navarro X. *Gene Expression Changes in the Injured Spinal Cord Following Transplantation of Mesenchymal Stem Cells or Olfactory Ensheathing Cells*. PLoS ONE. 2013;8(10): e76141. doi: 10.1371/journal.pone.0076141
- Tuttolomondo A, Di Raimondo D, di Sciacca R, Pinto A, Licata G. *Inflammatory cytokines in acute ischemic stroke*. Curr Pharm Des. 2008;14(33):3574-3589. doi: 10.2174/138161208786848739
- Ventre M, Netti PA. *Controlling Cell Functions and Fate with Surfaces and Hydrogels: The Role of Material Features in Cell Adhesion and Signal Transduction*. Gels. 2016;2(1):12. doi: 10.3390/gels2010012

- Verma S, Garkhal K, Mittal A, Kumar N. *Biodegradable Polymers for Emerging Clinical Use in Tissue Engineering*. *Biodegradable Polymers in Clinical Use and Clinical Development*. 2011;565-629. doi: 10.1002/9781118015810.ch16
- Viau S, Chabrand L, Bouilliez J, Eap S, Bertholet P, Bouckenoghe T, Goudaliez F, Delorme B. *A Standardized and Characterized GMP-Compliant Human Platelet Lysate for Efficient Expansion of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*. *Cytotherapy*. 2016;18(6):76. doi: 10.1016/j.jcyt.2016.03.254
- Vives J, Rodríguez L, Coca MI, Reales L, Cabrera-Pérez R, Martorell L. *Use of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells, Fibrin, and Scaffolds in the Production of Clinical Grade Bone Tissue Engineering Products*. *Methods Mol Biol*. 2021;2286:251-261. doi: 10.1007/7651_2020_280
- Wagenaar N, de Theije CGM, de Vries LS, Groenendaal F, Benders MJNL, Nijboer CHA. *Promoting neuroregeneration after perinatal arterial ischemic stroke: neurotrophic factors and mesenchymal stem cells*. *Pediatr Res*. 2018;83(1-2):372-384. doi: 10.1038/pr.2017.243
- Wakabayashi K, Nagai A, Sheikh AM, Shiota Y, Narantuya D, Watanabe T, Masuda J, Kobayashi S, Kim SU, Yamaguchi S. *Transplantation of human mesenchymal stem cells promotes functional improvement and increased expression of neurotrophic factors in a rat focal cerebral ischemia model*. *J Neurosci Res*. 2010;88(5):1017-1025. doi: 10.1002/jnr.22279
- Wang F, Tang H, Zhu J, Zhang JH. *Transplanting Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Ischemic Stroke*. *Cell Transplant*. 2018;27(12):1825-1834. doi: 10.1177/0963689718795424
- Wang H, Nagai A, Sheikh AM, Liang XY, Yano S, Mitaki S, Ishibashi Y, Kobayashi S, Kim SU, Yamaguchi S. *Human mesenchymal stem cell transplantation changes proinflammatory gene expression through a nuclear factor- κ B-dependent pathway in a rat focal cerebral ischemic model*. *J Neurosci Res*. 2013;91(11):1440-1449. doi: 10.1002/jnr.23267
- Wang Y, Yang J, Li H, Wang X, Zhu L, Fan M, Wang X. *Hypoxia promotes dopaminergic differentiation of mesenchymal stem cells and shows benefits for transplantation in a rat model of Parkinson's disease*. *PLoS One*. 2013;8(1):e54296. doi: 10.1371/journal.pone.0054296
- Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. *A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype*. *PLoS One*. 2010;5(4):e10088. doi: 10.1371/journal.pone.0010088
- Wedzinska A, Figiel-Dabrowska A, Kozłowska H, Sarnowska A. *The Effect of Proinflammatory Cytokines on the Proliferation, Migration and Secretory Activity of Mesenchymal Stem/Stromal Cells (WJ-MSCs) under 5% O₂ and 21% O₂ Culture Conditions*. *J. Clin. Med*. 2021;10:1813. doi: 10.3390/jcm10091813
- Widowati W, Wijaya L, Bachtiar I, Gunanegara RF, Sugeng SU, Irawan YA, Sumitro SB, Widodo MA. *Effect of oxygen tension on proliferation and characteristics of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells*. *Biomark. Genom. Med*. 2014;6(1):43-48. doi: 10.1016/j.bgm.2014.02.001
- Willerth SM, Sakiyama-Elbert SE. *Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery*. In: *StemBook* [Internet].

Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute. 2008. doi: 10.3824/stembook.1.1.1

- Wu X, Jiang J, Gu Z, Zhang J, Chen Y, Liu X. *Mesenchymal stromal cell therapies: immunomodulatory properties and clinical progress*. Stem Cell Res Ther. 2020;11(1):345. doi: 10.1186/s13287-020-01855-9
- Xu S, Lu J, Shao A, Zhang JH, Zhang J. *Glial Cells: Role of the Immune Response in Ischemic Stroke*. Front Immunol. 2020;11:294. doi: 10.3389/fimmu.2020.00294
- Yang C, Wu M, You M, Chen Y, Luo M, Chen Q. *The therapeutic applications of mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues in autoimmune diseases*. Stem Cell Res Ther. 2021;12(1):103. doi: 10.1186/s13287-021-02158-3
- Zhang K, Shi Z, Zhou J, Xing Q, Ma S, Li Q, Zhang Y, Yao M, Wang X, Li Q, Li J, Guan F. *Potential application of an injectable hydrogel scaffold loaded with mesenchymal stem cells for treating traumatic brain injury*. J Mater Chem B. 2018;6(19):2982-2992. doi: 10.1039/c7tb03213g
- Zhang L, Wang LM, Chen WW, Ma Z, Han X, Liu CM, Cheng X, Shi W, Guo JJ, Qin JB, Yang XQ, Jin GH, Zhang XH. *Neural differentiation of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells improves the recovery of neurological function after transplantation in ischemic stroke rats*. Neural Regen Res. 2017;12(7):1103-1110. doi: 10.4103/1673-5374.211189
- Zhou ZX, Chen YR, Zhang JY, Jiang D, Yuan FZ, Mao ZM, Yang F, Jiang WB, Wang X, Yu JK. *Facile Strategy on Hydrophilic Modification of Poly(ϵ -caprolactone) Scaffolds for Assisting Tissue-Engineered Meniscus Constructs In Vitro*. Front Pharmacol. 2020;11:471. doi: 10.3389/fphar.2020.00471

Źródła internetowe:

<https://ezdrowie.gov.pl/portal/home/zdrowe-dane/raporty/nfz-o-zdrowiu-udar-niedokrwienny-mozgu>