

mgr inż. Aleksandra Bzinkowska

**Badanie interakcji zachodzących w niszy neuralnych komórek
macierzystych z udziałem mezenchymalnych komórek
macierzystych/zrębowych pochodzących z galarety Whartona**

**Analysis of interactions occurring within the neural stem cell niche
modulated by Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem/stromal cells**

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

Promotor: prof. dr hab. Anna Sarnowska

Promotor pomocniczy: dr Marzena Zychowicz



Postępowanie w sprawie nadania stopnia doktora
w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława
Mossakowskiego PAN

Warszawa, 2025

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania:

prof. dr hab. Annie Sarnowskiej,
za życzliwe wsparcie, cenne wskazówki, cierpliwość
oraz nieocenioną pomoc w trakcie przygotowywania niniejszej rozprawy.

dr Marzenie Zychowicz
– za owocne dyskusje, wiarę oraz cenne rady, nie tylko te naukowe

Dziękuję Koleżankom i Kolegom z PBT oraz Banku Tkanek i Komórek,
a w szczególności Klaudii, Pauli, Moni, Magdzie i Adze,
z którymi dzieliłam codzienność w czasie pracy nad badaniami
– Wasza pomoc, rozmowy przy kawie i uśmiech
były bezcenne w chwilach zwątpienia.

Przede wszystkim dziękuję Mojej Rodzinie,
Rodzicom, Babci oraz Bratu
– bez Was nie byłoby mnie w tym miejscu.

Szczególne podziękowania kieruję dla Mojego Męża,
- za cierpliwość i wsparcie, które dawały mi siłę,
by nie poddawać się wtedy, gdy droga stawała się szczególnie trudna.

Wszystkim Tym, którzy we Mnie wierzyli.

Publikacje

Część wyników niniejszej rozprawy doktorskiej została opublikowana:

1. **Bzinkowska A**, Sarnowska A. Assessment of the Dose-Dependent Effect of Human Platelet Lysate on Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cells Culture for Manufacturing Protocols. *Stem Cells Cloning*. 2024; 5;17:21-32. doi: 10.2147/SCCAA.S471118.
2. Kaminska A,* Radoszkiewicz K*, Rybkowska P*, **Wedzińska A***, Sarnowska A. Interaction of Neural Stem Cells (NSCs) and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) as a Promising Approach in Brain Study and Nerve Regeneration. *Cells*. 2022; 11(9):1464. <https://doi.org/10.3390/cells11091464>

*- autorzy równorzędni

Pozostałe publikacje z udziałem doktorantki

1. Radoszkiewicz K, Bzinkowska A, Sypecka M, Sulejczak D, Ferrari D, Gelati M, Luigi Vescovi A, Sarnowska A. *Unraveling the impact of human cerebrospinal fluid on human neural stem cell fate*. *Front Cell Dev Biol*. **2025** Mar 13;13:1527557. doi: 10.3389/fcell.2025
2. Radoszkiewicz K, Bzinkowska A, Chodkowska M, Rybkowska P, Sypecka M, Zembrzuska-Kaska I, Sarnowska A., *Deciphering the impact of cerebrospinal fluid on stem cell fate as a new mechanism to enhance clinical therapy development*. *Front. Neuroscience*, **2024**, Jan 12;17:1332751. doi: 10.3389/fnins.2023.1332751
3. Smolinska A.*, Bzinkowska A.*, Rybkowska P., Chodkowska M., Sarnowska A.; *Promising markers in the context of mesenchymal stem/stromal cells subpopulations with unique properties*. *Stem Cells Int*. **2023**, Sep 20;2023:1842958. doi: 10.1155/2023/1842958;
4. Sypecka M, Bzinkowska A, Sulejczak D, Dabrowski F, Sarnowska A. *Evaluation of the Optimal Manufacturing Protocols and Therapeutic Properties of Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Wharton's Jelly*. *Int J Mol Sci*. **2022** Dec 30;24(1):652. doi: 10.3390/ijms24010652
5. Wędzińska 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** Apr 21;10(9):1813. doi: 10.3390/jcm10091813; IF=4.96
6. Kaminska A., Wędzińska A., Kot M., Sarnowska A.; *Effect of Long-Term 3D Spheroid Culture on WJ-MSC*; *Cells*. **2021** Mar 24;10(4):719. doi: 10.3390/cells10040719
7. Wierzbicki M., Hotowy A., Kutwin M., Jaworski S., Bałaban J., Sosnowska M, Wójcik B., Wędzińska A., Chwalibog A, Sawosz E., *Graphene Oxide Scaffold Stimulates Differentiation and Proangiogenic Activities of Myogenic Progenitor Cells*; *Int J Mol Sci*. **2020** Jun 11;21(11):4173. doi: 10.3390/ijms21114173

Finansowanie badań

Przeprowadzone badania były w ramach Szkoły Doktorskiej Medycyny Translacyjnej i finansowane z następujących grantów:

- grant OPUS finansowany przez Narodowe Centrum Nauki, nr 2018/31/B/NZ4/0317
- grant Fundusz Badań Własnych IMDiK PAN (FBW-08)
- grant statutowy nr 4 (IMDiK PAN)



N A R O D O W E C E N T R U M N A U K I

Spis treści

Wykaz skrótów	10
Streszczenie	12
Streszczenie w języku angielskim	14
Innowacyjność rozprawy.....	16
Wstęp	18
Koncepcja niszy komórek macierzystych	18
Regulacja procesów w niszy	18
Nisza neuralnych komórek macierzystych	19
Mezenchymalne komórki macierzyste/ zrębowe pozyskane z galarety Whartona (WJ-MSC).....	26
Cele pracy	32
Materiały i metody	33
MODELE IN VITRO	33
1. Izolacja i hodowla WJ-MSC	33
2. Charakterystyka WJ-MSC.....	33
2.1. Analiza markerów mezenchymalnych metodą cytometrii przepływowej	33
2.2. Ocena potencjału mezodermalnego WJ-MSC	34
2.3. Ocena potencjału klonogennego WJ-MSC	35
3. Analiza migracji w środowisku o różnej zawartości czynników odżywczych.....	35
4. Analiza proliferacji.....	36
5. Analiza cyklu komórkowego.....	36
6. Hodowla i charakterystyka komórek śródbłonna naczyń krwionośnych (HUVEC)	36
Analiza zdolności do wychwytu deacetylowanych lipoprotein niskiej gęstości	36
Analiza zdolności do tworzenia struktur naczyniopodobnych - tubularnych	37
7. Hodowla i charakterystyka ludzkich neuralnych komórek macierzystych (NSC/NPC) ...	37
8. Analiza współhodowli komórkowych (WJ-MSC+ HUVEC oraz WJ-MSC+ NSC/NPC).....	37
8.1. Barwienie przyżyciowe komórek	39
8.2. Barwienie immunofluorescencyjne	39
8.3. Test oceny żywotności komórek.....	40

8.4. Test migracji.....	41
8.5. Izolacja RNA i reakcja odwrotnej transkrypcji (RT-PCR)	41
8.6. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (qPCR) – analiza ekspresji genów	42
8.7. Analiza sekretomu we współhodowlach komórkowych	43
MODEL EX VIVO	44
1. Organotypowa hodowla skrawków hipokampa	44
2. Model uszkodzenia ischemicznego skrawków hipokampa szczura (OGD).....	45
3. Współhodowla organotypowych skrawków hipokampa z WJ-MSC i NSC/NPC.....	45
3.1. Analiza właściwości neuroprotektoryjnych komórek WJ-MSC i NSC/NPC	46
3.2. Analiza sekretomu WJ-MSC i NSC/NPC.....	46
ANALIZA STATYSTYCZNA	47
Graficzny schemat doświadczeń	48
Wyniki	49
1. Analiza fenotypu WJ-MSC	49
2. Modułacja właściwości biologicznych WJ-MSC przez różne stężenia czynników odżywczych (lizatu płytkowego).....	50
2.1. Wpływ stężenia hLP na podstawowe parametry hodowli WJ-MSC.....	51
2.2. Ocena proliferacji i migracji WJ-MSC w środowisku o niskiej i wysokiej zawartości czynników odżywczych.	52
2.3. Analiza sekretomu WJ-MSC w środowisku o różnej zawartości czynników odżywczych.	53
3. Udział WJ-MSC w odbudowie komponentu naczyniowego niszy komórkowej - analiza interakcji WJ-MSC z komórkami śródbłonna naczyń krwionośnych.....	55
3.1. Analiza fenotypu komórek śródbłonna (HUVEC).....	56
3.2. Charakterystyka relacji przestrzennych we współhodowlach WJ-MSC+HUVEC ...	56
3.3. Analiza zależności proliferacji populacji WJ-MSC i HUVEC	60
3.4. Ocena wpływu obecności komórek HUVEC na zmiany ekspresji genów w WJ-MSC	
61	
4. Ocena pośrednich i bezpośrednich interakcji pomiędzy WJ-MSC a NSC/NPC	63
4.1. Analiza fenotypu NSC/NPC	63

4.2.	Charakterystyka relacji przestrzennych we współhodowlach WJ-MSC + NSC/NPC	64
4.3.	Wpływ obecności NSC/NPC na zmiany w ekspresji genów WJ-MSC.....	67
4.4.	Ocena odpowiedzi WJ-MSC na obecność NSC/NPC – analiza sekretomu	68
5.	Wpływ obecności uszkodzonej ischemicznej tkanki nerwowej na odpowiedź komórek WJ-MSC.....	70
5.1.	Ocena wpływu neuroprotektynowego WJ-MSC w obecności NSC/NPC na uszkodzoną ischemiczną tkankę nerwową	70
5.2.	Ocena wpływu obecności uszkodzonej ischemicznej tkanki nerwowej na zmiany w sekrecji WJ-MSC 2D vs 3D.....	71
5.3.	Ocena wpływu obecności uszkodzonej ischemicznej tkanki nerwowej na zmiany w sekrecji WJ-MSC w obecności egzogennych ludzkich NSC/NPC	72
5.4.	Analiza wpływu obecności uszkodzonej ischemicznej tkanki nerwowej na zmiany w ekspresji genów WJ-MSC w obecności egzogennych ludzkich NSC/NPC.....	75
6.	Dyskusja	77
7.	Wnioski.....	87
8.	Bibliografia.....	88

Wykaz skrótów

AAS – mieszanina antybiotyków i antymykotyków (ang. Antibiotic Antimycotic Solution)

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

BDNF - neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego (ang. Brain Derived Neurotrophic Factor)

bFGF - zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. Basic Fibroblast Growth Factor)

CMFDA – zielony, fluorescencyjny znacznik komórkowy: 5-ChloroMethyl-Fluorescein-DiAcetate

CMTMR - pomarańczowy, fluorescencyjny znacznik komórkowy: 5-(and-6)-(((4ChloroMethyl)Benzoyl)Amino) TetraMethylRhodamine

DIV – dni w hodowli in vitro (ang. days in vitro)

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

ECM – macierz zewnątrzkomórkowa (ang. Extracellular Matrix)

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

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

GDNF – czynnik wzrostu pochodzenia glejowego (ang. Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor)

GFAP – glejowe kwaśne białko włóknkowe (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)

hPL – ludzki lizat płytkowy (ang. human Platelet Lysate)

HSC – hematopoetyczne komórki macierzyste (ang. hematopoietic stem cells)

HUVEC – ludzkie komórki śródbłónka żyły pępowinowej (ang. Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

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

IL – interleukina

Ki67 - białko obecne w jądrach komórek aktywnych mitotycznie, marker proliferacji komórek

KM – komórki macierzyste

MSC – mezenchymalne komórki macierzyste/ zrębowe; mezenchymalne komórki macierzyte/stromalne

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

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

NSC/NPC – neuralne komórki macierzyste/ progenitorowe (ang. Neural Stem Cells/ Neural Progenitor Cells)

NVU – jednostka neuro-naczyniowa (ang. Neuovascular Unit)

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

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

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

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

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

PFA – paraformaldehyd

PI – jodek propidyny

PLL – poli- L- lizyna

PMR – płyn mózgowo- rdzeniowy

RT – temperatura pokojowa (ang. room temperature)

qNSC – neuralne komórki macierzyste w stanie spoczynku (ang. quiescent neural stem cells)

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

SVZ – strefa okołokomorowa (ang. Subventricular Zone)

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

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

VEGFR1 – receptor czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego 1 (ang. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1)

VEGFR2 - receptor czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego 2 (ang. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2)

VEGFR3 - receptor czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego 3 (ang. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3)

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

Streszczenie

Zdolności regeneracyjne oraz prawidłowy rozwój tkanek i narządów w dużym stopniu zależą od obecnych w nich komórek macierzystych (KM). KM posiadają zdolność do samoodnowy i różnicowania w komórki wyspecjalizowane, zdolne do funkcjonalnego zastąpienia uszkodzonej tkanki. Za procesy te odpowiedzialne jest całe mikrośrodowisko zwane niszą komórkową. W skład niszy wchodzi zarówno komponenty komórkowe takie jak KM, komórki zrębu oraz komórki śródbłónka tworzące naczynia krwionośne, jak i elementy niekomórkowe (macierz zewnątrzkomórkowa i rozpuszczalne cząsteczki sygnałowe). W mózgu dorosłego człowieka szczególne znaczenie ma nisza neuralnych komórek macierzystych, zlokalizowana w strefie komorowej (SVZ) i subgranularnej (SGZ). Jej integralność, zależna m.in. od interakcji z komórkami zrębu i śródbłónka, tworzącymi tzw. jednostkę neuro-naczyniową (ang. neurovascular unit; NVU), ulega zaburzeniu w wyniku np. niedokrwienia czy procesów neurodegeneracyjnych, co ogranicza potencjał regeneracyjny mózgu.

Choć mezenchymalne komórki macierzyste/zrębowe (MSC) fizjologicznie nie występują w niszy neuralnej, ich właściwości t.j. zdolność do immunomodulacji czy aktywność wydzielnicza czynią je funkcjonalnym odpowiednikiem komórek wspomagających. W szczególności MSC izolowane z galarety Whartona (WJ-MSC), ze względu na swoje wczesnorozwojowe pochodzenie wyróżniają się wysokim potencjałem parakrynnym, co sprawia, że mogą wspierać przeżycie i różnicowanie neuralnych komórek macierzystych oraz progenitorów neuralnych (NSC/NPC) oraz integralność NVU. Stanowi to podstawę do ich wykorzystania zarówno jako modelu do badań interakcji komórek wspierających vs KM w niszy, jak również potencjalnej terapii wspomagającej jej funkcjonowanie po uszkodzeniach.

Celem mojej pracy było zbadanie mechanizmów i interakcji zachodzących w niszy neuralnej w obecności WJ-MSC oraz ocena czy WJ-MSC, mimo że fizjologicznie nie występują w tej niszy, mogą modulując mikrośrodowisko aktywować NSC/NPC i wspierać integralność NVU przyczyniając się do rozwoju nowych strategii terapeutycznych. Badania obejmowały analizę: (i) wpływu czynników środowiskowych na podstawowe parametry WJ-MSC, (ii) interakcji WJ-MSC z komórkami śródbłónka, krytycznymi dla utrzymania homeostazy niszy oraz (iii) wpływu obecności NSC/NPC na aktywność wydzielniczą WJ-MSC, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w modelu ischemicznego uszkodzenia tkanki nerwowej.

Uzyskane wyniki wykazały, że ograniczona dostępność czynników odżywczych nie wpływa na zatrzymanie cyklu komórkowego oraz proliferacji WJ-MSC. Co więcej, nie ogranicza również ich zdolności migracyjnych i wydzielniczych. W kolejnym etapie badań skoncentrowano się na interakcjach WJ-MSC z głównymi komponentami niszy neuralnej- komórkami śródbłónka oraz neuralnymi komórkami macierzystymi/progenitorowymi (NSC/NPC) – w zależności od warunków przestrzennych hodowli (2D vs 3D). W warunkach 2D obserwowano silny potencjał migracyjny WJ-MSC w kierunku HUVEC, natomiast w hodowli przestrzennej WJ-MSC otaczały komórki śródbłónka (HUVEC),

zwiększając jednocześnie ich przeżywalność. Analiza ekspresji genów ujawniła, że w warunkach 3D bezpośredni kontakt komórek wyraźnie wzmacniał klasyczną angiogenezę zależną od VEGF-A i VEGFR3, co wskazuje na kluczowe znaczenie fizycznej interakcji między WJ-MSC a HUVEC dla organizacji naczyń. Natomiast w warunkach pośrednich, gdy komórki nie pozostawały w bezpośrednim kontakcie, lecz współdzieliły kompartment hodowlany, dominował mechanizm, w którym WJ-MSC kompensowały brak bezpośredniego kontaktu głównie poprzez zwiększoną ekspresję VEGF-C.

W kolejnym etapie przeanalizowano oddziaływania WJ-MSC z NSC/NPC. W warunkach współhodowli 2D, komórki obu populacji rozmieszczały się w sposób losowy, przy czym obserwowano powstawanie połączeń pomiędzy NSC/NPC, a WJ-MSC. W układach trójwymiarowych WJ-MSC tworzyły struktury sferyczne, zajmując centralne położenie, podczas gdy NSC/NPC lokalizowały się na ich obrzeżach, tworząc układ przestrzenny przypominający organizację niszy. Obecność WJ-MSC w hodowli pośredniej skutkowała zwiększeniem udziału komórek GFAP-dodatnich w populacji NSC/NPC, przy równoczesnym zmniejszeniu frakcji A2B5-dodatniej. Z kolei fenotyp WJ-MSC na poziomie białkowym pozostawał niezmienny, natomiast analiza ekspresji genów wykazała wzrost markerów neuralnych (m.in. GFAP, S100 β) oraz angiogennych (m.in. VEGF-A, VEGF-C). Zmiany te znalazły odzwierciedlenie w analizie sekretomu, potwierdzając, że obecność NSC/NPC indukuje u WJ-MSC aktywację wydzielniczą, ukierunkowaną na wspieranie procesów neurogenety i angiogenezy.

Dodatkowo, w modelu organotypowej hodowli skrawków hipokampa (regionu stanowiącego lokalizację niszy neuralnej, jak i jednostek neuro-naczyniowych; NVU), po uszkodzeniu ischemicznym obserwowano działanie neuroprotektoryjne WJ-MSC. Analiza wybranych czynników wydzielniczych wykazała, iż kontakt z uszkodzoną tkanką, prowadził do długotrwałego uwalniania przez WJ-MSC czynników sprzyjających angiogenezie (m.in. HGF, angiogenina, VEGF-C) i neuroregeneracji (m.in. BDNF, GDNF), przy czym dynamika ich wydzielania zmieniała się w czasie, co wskazuje na zdolność WJ-MSC do adaptacyjnej odpowiedzi na sygnały płynące z uszkodzonej tkanki.

Uzyskane wyniki wskazują, że WJ-MSC potencjalnie mogą modulować interakcje zarówno z komórkami śródbłonna, jak i z progenitorami neuralnymi, pomimo iż nie występują fizjologicznie w niszy neuralnej. W warunkach *in vitro* WJ-MSC wzmacniają przeżywalność komórek śródbłonna i stymulują angiogenezę, a w kontakcie z NSC/NPC indukują przestrzenną organizację przypominającą niszę oraz długotrwałą aktywację wydzielniczą sprzyjającą neurogenety. W modelu uszkodzenia ischemicznego wykazują dodatkowo działanie neuroprotektoryjne i adaptacyjną odpowiedź sekrecyjną. Łącznie potwierdza to ich zdolność do wspierania integralności i regeneracyjnego potencjału niszy neuralnej oraz uzasadnia dalsze badania w kierunku kandydatów do terapii chorób neurodegeneracyjnych i uszkodzeń OUN.

Streszczenie w języku angielskim

Regenerative capacity and the relevant development of tissues and organs are largely dependent on the presence of resident stem cells (SC). These cells can self-renew and differentiate into specialised cell types that can replace damaged tissue. The regulation of these processes is orchestrated by the surrounding microenvironment, commonly referred to as the stem cell niche. This niche comprises both cellular components, including SC, stromal cells, and blood vessels, as well as non-cellular elements such as the extracellular matrix and soluble signaling molecules. In the adult human brain, the neural stem cell niche, located within the subventricular zone (SVZ) and the subgranular zone (SGZ), is of particular significance. Its integrity, which is critically dependent on interactions with stromal and endothelial cells that constitute the neurovascular unit (NVU), is disrupted by ischemic injury and neurodegeneration. This limited the brain's regenerative potential.

Although mesenchymal stem/stromal cells (MSC) are not physiologically present in the neural niche, their properties, such as immunomodulatory capacity and secretory activity, make them functionally appropriate for supporting cells. In particular, MSC derived from Wharton's jelly (WJ-MSC) are characterized by their early developmental origin, which enables them to support the survival and differentiation of neural stem cells and neural progenitor cells (NSC/NPC), as well as the integrity of the NVU. These attributes explain why they are appropriate for use as a model to investigate supportive cell-stromal cell (SC) interactions within the niche and as a potential therapeutic strategy to improve niche function after injury.

The aim of this study was to investigate the mechanisms and interactions occurring within the NSC niche in the presence of WJ-MSC, and to assess the ability of WJ-MSC to activate NSC/NPC and support NVU and niche integrity through modulation of the microenvironment. This could potentially contribute to the development of novel therapeutic strategies. The study included the following analyses: (i) the impact of environmental factors on the basic parameters of WJ-MSCs; (ii) the interactions between WJ-MSCs and endothelial cells, which are critical for maintaining niche homeostasis; and (iii) the effect of the presence of NSCs/NPCs on the secretory activity of WJ-MSCs, including under conditions of ischemic neural tissue injury.

The results obtained demonstrated that limited nutrient availability does not affect the cell cycle progression or proliferative capacity of WJ-MSCs. Moreover, it does not impair their migratory potential or secretory activity.

Next, we examined the interactions between WJ-MSCs and the main components of the neural niche (endothelial cells and NSC/NPC) under different spatial culture conditions (2D vs. 3D). It was demonstrated that WJ-MSC, in both 2D and 3D cultures, surrounded endothelial cells (HUVEC), thus enhancing their survival. In addition, WJ-MSC showed a strong migratory potential toward HUVEC. Analysis of gene expression levels under 3D conditions revealed that

direct cell-to-cell contact markedly enhances VEGF-A/VEGFR3-dependent angiogenesis. This highlights the important role of physical interaction between WJ-MSC and HUVEC in vascular formation. In contrast, under indirect conditions, a mechanism predominated, where WJ-MSCs compensated for the absence of direct contact primarily through increased VEGF-C expression.

In the next stage, we analysed the interactions between WJ-MSC and NSC/NPC. Under 2D co-culture conditions, the cells from both populations were distributed irregularly. However, the formation of connections between NSC/NPC and WJ-MSC was observed. In 3D systems, WJ-MSCs formed spheroid-like structures in a central position, while NSCs/NPCs were located at the periphery. This spatial organisation was similar to that seen in niches. Indirect exposure to WJ-MSCs in 2D cultures increased the proportion of GFAP-positive cells within the NSC/NPC population and reduced the A2B5-positive fraction. While the protein-level phenotype of WJ-MSC remained unchanged, gene expression analysis revealed upregulation of neural markers (e.g., GFAP, S100 β) and angiogenic markers (e.g., VEGF-A, VEGF-C). These alterations were corroborated by secretome profiling, which confirmed that the presence of NSC/NPCs induces lasting secretory activation in WJ-MSCs, promoting neurogenesis and angiogenesis.

Additionally, in the organotypic hippocampal slice ex vivo model, which represents a region that contains both the neural niche and the NVU, WJ-MSCs exhibited neuroprotective effects following ischemic injury. According to an analysis of selected secretory factors, the release of molecules that promote angiogenesis (e.g. HGF, angiogenin, and VEGF-C) and neuroregeneration (e.g. BDNF and GDNF) by WJ-MSCs is a long-term process caused by contact with damaged tissue. Changes in the secretion dynamics over time indicate the capacity of WJ-MSCs to adapt to signals derived from injured tissue.

In summary, WJ-MSC can modulate endothelial and neural progenitor interactions, enhance NVU survival, stimulate angiogenesis, and support neurogenesis despite not being native components of the neural niche. These results confirm their ability to reinforce the integrity and regenerative potential of the neural niche, providing a basis for further exploration of the use of WJ-MSCs in therapeutic strategies for neurodegenerative diseases and CNS injuries.

Innowacyjność rozprawy

1. Wykazano, że WJ-MSC, mimo braku fizjologicznej obecności w mózgu, mogą funkcjonalnie naśladować komórki wspierające w kontekście niszy neuralnej.
2. Udowodniono, że organizacja przestrzenna hodowli (2D vs 3D) wpływa na interakcje WJ-MSC z komórkami śródbłonna i progenitorami neuralnymi.
3. Uwidoczniono różnice w relacjach przestrzennych 2D i 3D pomiędzy WJ-MSC i HUVEC oraz WJ-MSC a NSC
4. Przedstawiono bilateralność interakcji WJ-MSC z NSC/NPC i WJ-MSC z HUVEC, prowadzącą do wzajemnej zmian fenotypu i aktywności wydzielniczej obu populacji.
5. Wykazano, że WJ-MSC dostosowują swój sekretom do panującego mikrośrodowiska i obecności innych komórek, uruchamiając odmienne szlaki proangiogenne i neurotroficzne
6. Wykorzystano hodowlę organotypowych skrawków hipokampa jako model łączący kontekst niszy neuralnej i jednostki neuro-naczyniowej.

Wstęp

Koncepcja niszy komórek macierzystych

Komórki macierzyste (KM) to specyficzna populacja komórek posiadająca wyjątkową zdolność do samoodnowy a także różnicowania się w komórki wyspecjalizowane. W dorosłym organizmie stanowią one rezerwuár będący jego siłą regeneracyjną. Zlokalizowane są w charakterystycznym mikrośrodowisku zwanym niszą komórkową. Idea niszy komórek macierzystych została opisana w 1978 r. w oparciu o badania dotyczące hematopoetycznych komórek macierzystych (HSC – *ang. hematopoietic stem cells*) u ssaków. Wykazano wówczas, że na przeżycie HSC wpływa otoczenie, w tym interakcje HSC z komórkami śródbłónka i makrofagami wspierającymi ich przeżycie i różnicowanie [1]. Dalsze badania potwierdziły, że na przeżycie i dalsze losy komórek macierzystych/ progenitorowych ma wpływ wiele innych typów komórek zwanych komórkami zrębu niszy HSC m.in. osteocyty, adipocyty, fibroblasty czy mezenchymalne komórki macierzyste/ zrębowe (MSC) [2]. W kolejnych latach wraz z odkrywaniem nowych lokalizacji KM, nisza została zdefiniowana jako mikrośrodowisko złożone z komórek macierzystych oraz komórek wspierających, a także z macierzy zewnątrzkomórkowej i czynników rozpuszczalnych, które wspólnie regulują samoodnowę, różnicowanie i przeżycie komórek macierzystych, zapewniając zdolność tkanek do regeneracji [3]. W skład niszy wchodzi (i) komponent komórkowy tworzony przez komórki macierzyste oraz inne wyspecjalizowane typy komórek t.j. komórki podporowe/zrębowe, komórki śródbłónka naczyń krwionośnych, czy zróżnicowane komórki charakterystyczne dla danego narządu, a także (ii) komponent niekomórkowy, na który składają się elementy macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM – *ang. extracellular matrix*) o różnych właściwościach fizyko-chemicznych i czynniki rozpuszczalne np. czynniki wzrostu, hormony i cytokiny. Czynniki te są wydzielane przez znajdujące się w niszy komórki wspierające oraz same komórki macierzyste i mają zdolność precyzyjnego regulowania ich aktywności, w tym samoodnowy, różnicowania oraz utrzymywania w stanie *quiescence* (fazie G0 cyklu komórkowego). Z kolei macierz zewnątrzkomórkowa (ECM) stanowi złożoną sieć białek i węglowodanów, która nie tylko pełni funkcję rusztowania strukturalnego, ale również uczestniczy w transdukcji sygnałów, oddziałując na receptory powierzchniowe komórek macierzystych i modulując ich odpowiedź na czynniki wzrostowe, cytokiny czy bodźce mechaniczne. W ten sposób ECM, w połączeniu z sygnałami parakrynnymi i autokrynnymi, aktywnie kształtuje mikrośrodowisko niszy i współdecyduje o losach komórek macierzystych [4,5].

Regulacja procesów w niszy

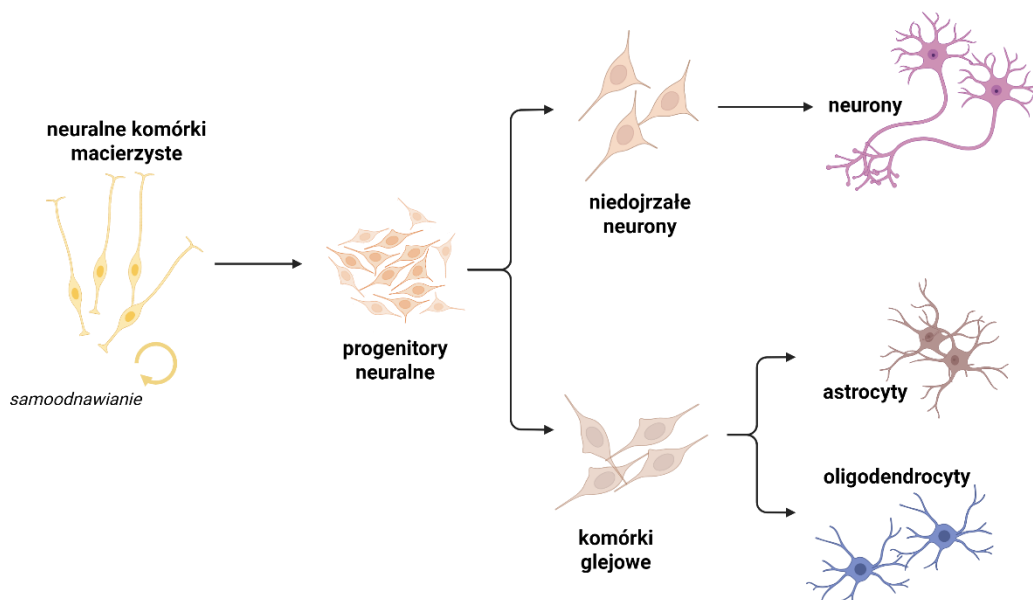
Nisza komórkowa reguluje aktywność KM poprzez interakcje jakie zachodzą pomiędzy jej poszczególnymi komponentami, a jej kluczową rolą jest regulacja cyklu komórkowego KM [6]. Wzajemne interakcje komórek prowadzą do decyzji o ich pozostaniu w stanie spoczynku lub wejściu w cykl komórkowy. Podczas podziałów symetrycznych powstają dwie identyczne

komórki o zdolności do samoodnowy, co uzupełnia rezerwuar KM i utrzymuje je w stanie niezróżnicowanym. Natomiast do podziałów asymetrycznych dochodzi, gdy pod wpływem bodźców wewnętrznych lub zewnętrznych (np. uszkodzenia, stresu oksydacyjnego czy procesu zapalnego) nisza wysyła sygnały, które mobilizują KM do różnicowania się w wyspecjalizowane typy komórek. W wyniku takiego podziału powstają dwie komórki potomne: jedna zachowująca właściwości komórki macierzystej i druga wchodząca na ścieżkę różnicowania, dając początek komórkom progenitorowym. Dzięki takiemu podziałowi możliwe jest jednoczesne zachowanie puli komórek macierzystych i rozpoczęcie procesu regeneracji poprzez dostarczenie do tkanki komórek progenitorowych.

Zdolności regeneracyjne narządów zależą od stanu niszy komórkowej, a więc od liczby i aktywności komórek macierzystych oraz komórek wspomagających. Tkanki dysponujące dużą pulą aktywnych komórek macierzystych, takie jak nabłonek jelitowy, skóra czy szpik kostny, odnowę przeprowadzają bardzo szybko. Natomiast w narządach, w których komórki macierzyste są nieliczne lub pozostają w stanie spoczynku, proces regeneracji jest znacznie ograniczony. Przykładem niszy o stosunkowo małej aktywności są neuralne komórki macierzyste (NSC- *ang. neural stem cells*), których odkrycie w mózgu okazało się szczególnie ważne dla rozwoju medycyny regeneracyjnej.

Nisza neuralnych komórek macierzystych

Mózg dorosłego człowieka charakteryzuje się ograniczoną zdolnością do regeneracji, którą przez wiele lat tłumaczono brakiem KM w tym narządzie. Do lat 60-tych XX wieku zgodnie z teorią Santiago Ramón y Cajal'a uważano, że wraz z końcem rozwoju układu nerwowego w okresie prenatalnym, został zakończony również proces wzrostu i regeneracji aksonów i dendrytów. Stwierdzenie to stało się nieaktualne, kiedy to w 1963 roku, w mózgach dorosłych szczurów odkryto dzielące się komórki, które posiadały zdolność różnicowania się w neurony [7]. Jednak dopiero w 1998 roku, grupa Gage'a przekazała pierwsze dowody na istnienie tych komórek w mózgu dorosłego człowieka [8]. Komórki te określono jako neuralne komórki macierzyste (NSC). NSC są specyficznym typem komórek które posiadają cechy typowe dla KM: są zdolne do samoodnowy, a także mogą różnicować się w bardziej wyspecjalizowane komórki nerwowe: oligodendrocyty, astrocyty oraz neurony (*Rycina 1*).

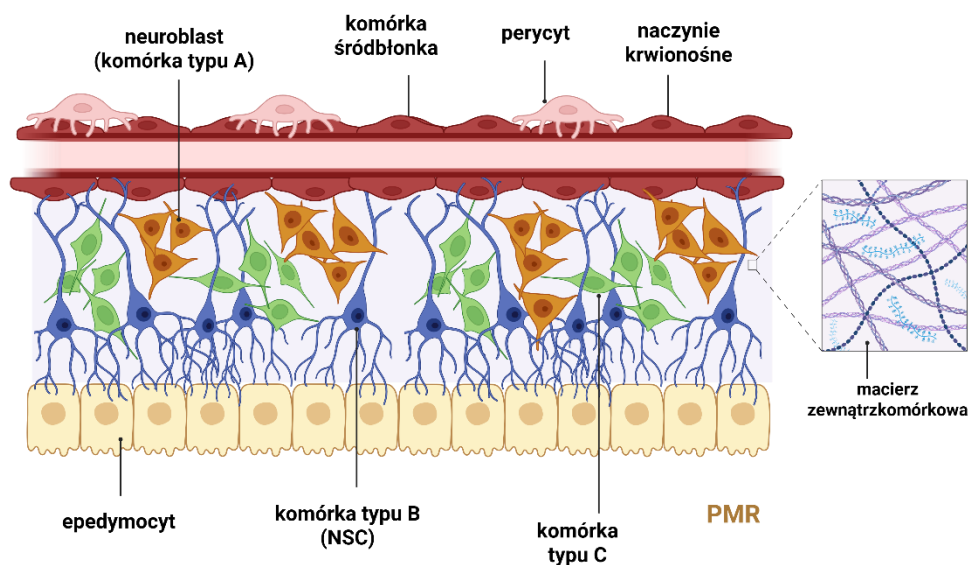


Rycina 1 Schemat różnicowania neuralnych komórek macierzystych. Rycina stworzona przy użyciu programu BioRender.com.

Neurogeneza jest procesem tworzenia nowych komórek nerwowych, który zachodzi zarówno w okresie prenatalnym (embrionalnym), jak i postnatalnym (dorosłym). W dojrzałym mózgu zostały zlokalizowane dwa obszary o aktywnej i ciągłej neurogenzie: strefa okołokomorowa komór bocznych (SVZ, *ang. subventricular zone*) oraz strefa podziarnista zakrętu zębatego hipokampa (SGZ, *ang. subgranular zone*). Istnieją doniesienia o plastyczności i rzadkich przypadkach neurogenyzy w innych obszarach mózgu (np. w korze czy prążkowie), ale ich znaczenie u człowieka jest kontrowersyjne i wciąż dyskutowane [9–11]. Składniki komórkowe niszy NSC różnią się w zależności od lokalizacji. Obie nisze zawierają astrocytopodobne komórki macierzyste, jednak różnią się organizacją, składem komórkowym i funkcją. W obszarze SGZ wyróżniamy komórki śródbłonna, komórki stromalne (podporowe), astrocyty, komórki mikrogleju, neuronalne komórki glejopodobne (typu I) oraz komórki bezwypustkowe (typu II). Nisza ta ukierunkowana jest głównie na lokalną neurogenezę w hipokampie. Nowe neurony integrują się lokalnie w zakręcie zębatym, różnicując w neurony ziarniste i biorą udział w plastyczności sieci neuronalnej. Obszar SVZ znajduje się w sąsiedztwie ściany komór bocznych dorosłego mózgu ssaków. Kluczową rolę wspierającą odgrywają komórki ependymy i śródbłonna. W odróżnieniu od gryzoni, u człowieka, powstające w tej niszy neuroblasty wykazują ograniczoną zdolność migracji, lecz nadal większą niż w SGZ.

Komórki macierzyste SVZ są klasyfikowane w różnych stanach zróżnicowania jako typ A, B lub C. Wyróżniamy: GFAP – pozytywne (GFAP- *ang. glial fibrillary acidic protein*) astrocytarne komórki macierzyste (komórki typu B1), monowarstwę komórek ependymalnych (komórki typu E), przejściowo aktywowane komórki progenitorowe (komórki typu C), neuroblasty

(komórki typu A) i komórki śródbłónka (Rycina 2). Komórki typu B są promienistymi, glejopodobnymi neuralnymi komórkami macierzystymi, które kontaktują się zarówno z płynem mózgowo-rdzeniowym w przestrzeni komorowej po stronie wierzchołkowej, jak i z naczyniami krwionośnymi [12]. Komórki typu B występują zazwyczaj w stanie spoczynku (*ang. quiescence*). Pod wpływem bodźców z niszy mogą zostać reaktywowane do proliferacji i dać początek komórkom typu C. Komórki typu C następnie proliferują i generują neuroblasty, które migrują wzdłuż naczyń krwionośnych i przechodzą do różnicowania w istniejących obwodach neuronalnych [13–15] m.in. ostatecznie różnicując się w neurony, które włączają się w obwody opuszki węchowej [16]. Podczas tego procesu, komórki różnicują się w astrocyty lub oligodendrocyty, ale również charakteryzują się wysoką śmiertelnością, co skutkuje bardzo ograniczoną liczbą nowych neuronów integrujących się z siecią neuronalną [17]. Ponadto, najnowsze dowody wskazują na fizjologiczne starzenie się niszy, co skutkuje postępującą utratą jej funkcji, spadkiem zdolności samoodnowy i regeneracji NSCs w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) [18]. Procesy te są przyspieszane poprzez dodatkowe patologie t.j. zmiany zapalne lub pourazowe. Badania potwierdzają, że wraz z wiekiem zwiększa się heterogenność populacji w niszy. Pula NSC w spoczynku, niewrażliwych na aktywację zwiększa się, co powoduje obniżenie ich potencjału regeneracyjnego [19,20].



Rycina 2 Schemat niszy neuralnych komórek macierzystych obecnych w mózgu dorosłego człowieka: PMR- płyn mózgowo-rdzeniowy. Rycina stworzona przy użyciu programu BioRender.com.

KM charakteryzują się zdolnością do nieograniczonego podziału, pełniąc rolę rezerwuaru dla uszkodzonych tkanek. Jak wcześniej wspomniano, w niszy utrzymywane są w stanie spoczynku, w którym nie ulegają podziałom komórkowym. Kluczowe dla zachowania homeostazy tkanek jest utrzymana równowaga pomiędzy stanem spoczynku komórek macierzystych, a ich

aktywacją, prowadzącą do wejścia w cykl komórkowy i różnicowania się w komórki wyżej wyspecjalizowane, zdolne do zastąpienia uszkodzonej tkanki.

Los NSC determinują sygnały wysyłane ze środowiska niszy, które regulują zarówno cykl komórkowy jak i aktywności procesów naprawczych. W warunkach fizjologicznych neuralna nisza komórek macierzystych podtrzymywana jest przez wyspecjalizowane komórki pomocnicze, które zapewniają zarówno strukturalne, jak i sygnałowe wsparcie dla NSC [4]. Należą do nich: oligodendrocyty, astrocyty, mikroglej, ependymocyty, perycyty oraz komórki śródbłónka naczyń.

Oligodendrocyty oraz ich komórki prekursorowe pełnią istotne funkcje we wspieraniu dojrzewania i różnicowania neuronów na wczesnych etapach rozwoju oraz w regulacji różnicowania neuralnych komórek progenitorowych (NPC). Głównym mechanizmem regulującym to zjawisko jest wydzielanie czynników troficznych takich jak BDNF oraz NGF. Co więcej progenitory oligodendrocytów charakteryzują się zdolnością do migracji i proliferacji utrzymującą się przez całe życie. W kolejnych etapach różnicowania oligodendrocyty oraz ich prekursorzy odpowiedzialne są za mielinizację dojrzałych komórek neuralnych.

Astrocyty pełnią istotną rolę w utrzymaniu struktury niszy i są odpowiedzialne za tworzenie i utrzymywanie bariery krew- mózg (BBB – *ang. blood brain barrier*). Posiadają funkcje neuroprotekcyjne poprzez regulację przepływu krwi oraz odpowiedź immunologiczną. Komórki te chronią niszę przed ekcytoksycznością glutaminergiczną. Podobnie jak oligodendrocyty, astrocyty regulują proliferację i różnicowania NSC poprzez wydzielanie czynników troficznych takich jak BDNF, GDNF i morfogenów t.j. Wnt. W strefie SVZ (wcześniej wspomniane komórki typu B1) stanowią mieszaną populację pod względem właściwości neurogennych. Jedną z ważnych ról, które pełnią jest ich współpraca z układem naczyniowym. Komórki te stykają się z naczyniami krwionośnymi w miejscach o zwiększonej przepuszczalności BBB, umożliwiając małym cząsteczkom dyfuzyjnym przedostawanie się do strefy neurogenicznej [21]. Komórki typu B i C są w wyjątkowy sposób przystosowane do odbierania sygnałów z układu naczyniowego, takich jak hormony i czynniki wzrostu. Ponadto substancje te mogą kontrolować proliferację komórek w SVZ w warunkach fizjologii, jak i po urazie.

Istotnym elementem regulującym odpowiedź immunologiczną w mózgu jest mikroglej. Jego zadaniem jest monitorowanie mikrośrodowiska i reakcja na stan zapalny. Reakcja mikrogleju i jego polaryzacja związane są z aktualnym stanem mikrośrodowiska. W literaturze wyróżnia się dwa zasadnicze fenotypy aktywacji mikrogleju: prozapalny (M1), charakteryzujący się wydzielaniem cytokin takich jak IL-1 β , IL-6 czy TNF- α , oraz naprawczy (M2). Komórki mikrogleju mogą przechodzić między tymi fenotypami, dostosowując swoje funkcje do warunków środowiska [22]. Oprócz regulacji procesów immunologicznych, mikroglej pełni również rolę „oczyszczającą” usuwając w procesie fagocytozy uszkodzone fragmenty komórek, t.j. fragmenty

synaps czy mieliny. Co więcej komórki te wspierają również plastyczność mózgu, wpływając na rozwój nowych połączeń pomiędzy neuronami, procesy związane z pamięcią oraz uczeniem się [23,24]. Niestety wraz z wiekiem, spada zdolność do proliferacji mikrogleju, co ogranicza sprawność kontrolowanych przez te komórki procesów [25].

Kolejnym elementem pełniącym funkcje podporowo - modulacyjne są ependymocyty, czyli komórki wyściółki komór mózgu. Komórki te odpowiedzialne są za współtworzenie BBB oraz regulację transportu czynników pochodzących z płynu mózgowo-rdzeniowego takich jak jony czy hormony. Ponadto, ependymocyty są źródłem cząstek sygnałowych takich jak Wnt czy Shh wpływających na proliferację NSC [26,27].

Istotnym elementem strukturalnym niszy są perycyty - multipotencjalne komórki wspierające, które zlokalizowane są w okolicy naczyń krwionośnych. Otaczają je i przylegają ściśle do śródbłonna naczyń krwionośnych współpracując z nim i biorąc udział zarówno w stabilizacji BBB jak i promocji angiogenezy. Perycyty posiadają zdolność do reagowania na sygnały biochemiczne, interakcji z sąsiednimi komórkami oraz adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych [28].

Komórki śródbłonna będące elementami składowymi naczyń krwionośnych, nie tylko zapewniają wsparcie strukturalne, ale także aktywnie uczestniczą w komunikacji między neuronami, a układem naczyniowym. Ta dwukierunkowa interakcja ma kluczowe znaczenie dla procesów takich jak neurogeneza, synaptogeneza czy utrzymanie integralności BBB [29]. Co więcej, udowodniono, że kontakt NSC z komórkami śródbłonna naczyń krwionośnych przyczynia się do dojrzewania komórek typu B poprzez sygnalizację Notch [30].

Aby zapewnić prawidłowe funkcjonowanie mózgu, komórki w niszy komunikują się między sobą za pośrednictwem sieci połączeń wykorzystując różne mechanizmy w tym: wydzielanie parakryne, endokryne oraz autokryne; komunikację za pośrednictwem egzosomów i innych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych; kontakt bezpośredni komórka-komórka za pośrednictwem połączeń międzykomórkowych; sygnalizację chemiczną (poprzez neuroprzekaźniki) a także komunikację z wykorzystaniem właściwości mechanicznych ECM (naprężenie, ciśnienie, sztywność ECM) [29,31].

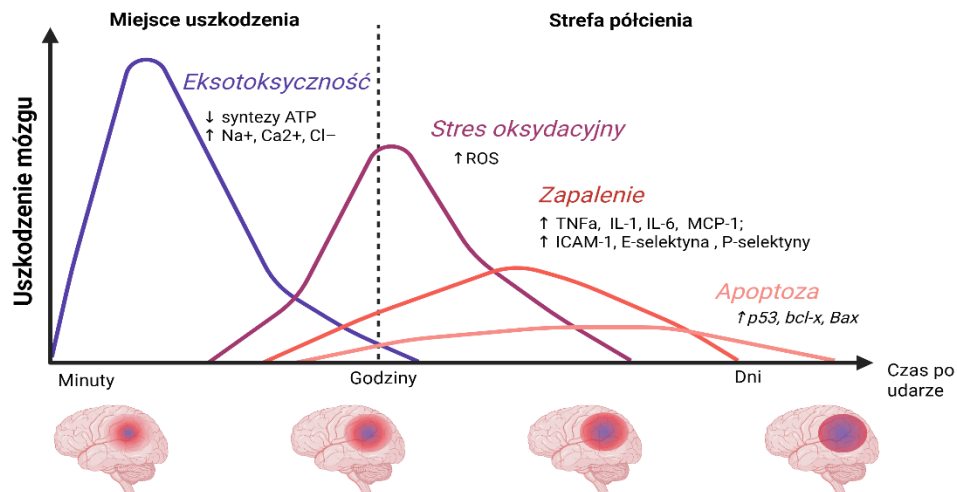
W niszach komórkowych występuje równowaga wielu szlaków sygnałowych. Choć pełnią one różne role, niektóre z nich odgrywają kluczową rolę w różnych tkankach. Sygnalizacja Notch odgrywa istotną rolę w tkankach dorosłych, definiując cechy komórek macierzystych. Inne szlaki regulacyjne obejmują m.in. czynniki wzrostu, takich jak czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF) czy glejopochodny czynnik neurotroficzny (GDNF) [32–34]. Ponad to,

niezwykle istotną funkcją niszy jest regulacja migracji oraz powrotu do ich miejsca pochodzenia. Suma tych wszystkich czynników stanowi o sile regeneracyjnej organizmu.

W odpowiedzi na uszkodzenie układu nerwowego, KM obecne w niszy mogą zostać aktywowane. Proces ten prowadzi do wprowadzenia ich w cykl komórkowy, proliferację, podział asymetryczny i migracji młodych neuroblastów w kierunku miejsca urazu [35–37]. Skuteczność tych mechanizmów jest jednak silnie zależna od integralności i prawidłowego funkcjonowania mikrośrodowiska niszy. Znaczne uszkodzenie jej struktury, w tym komórek podporowych, prowadzi do zahamowania procesów naprawczych i ograniczenia neurogenezy. Dlatego też istotne znaczenie ma zarówno odbudowa elementów niszy, jak i czasowe zastąpienie sygnałów aktywowanych endogennie, przez dostarczenie tych sygnałów z zewnątrz (np. w wyniku terapii komórkowej). Silnym czynnikiem uszkadzającym te procesy w mózgu jest uszkodzenie niedokrwienne

Nisza w warunkach niedokrwienia

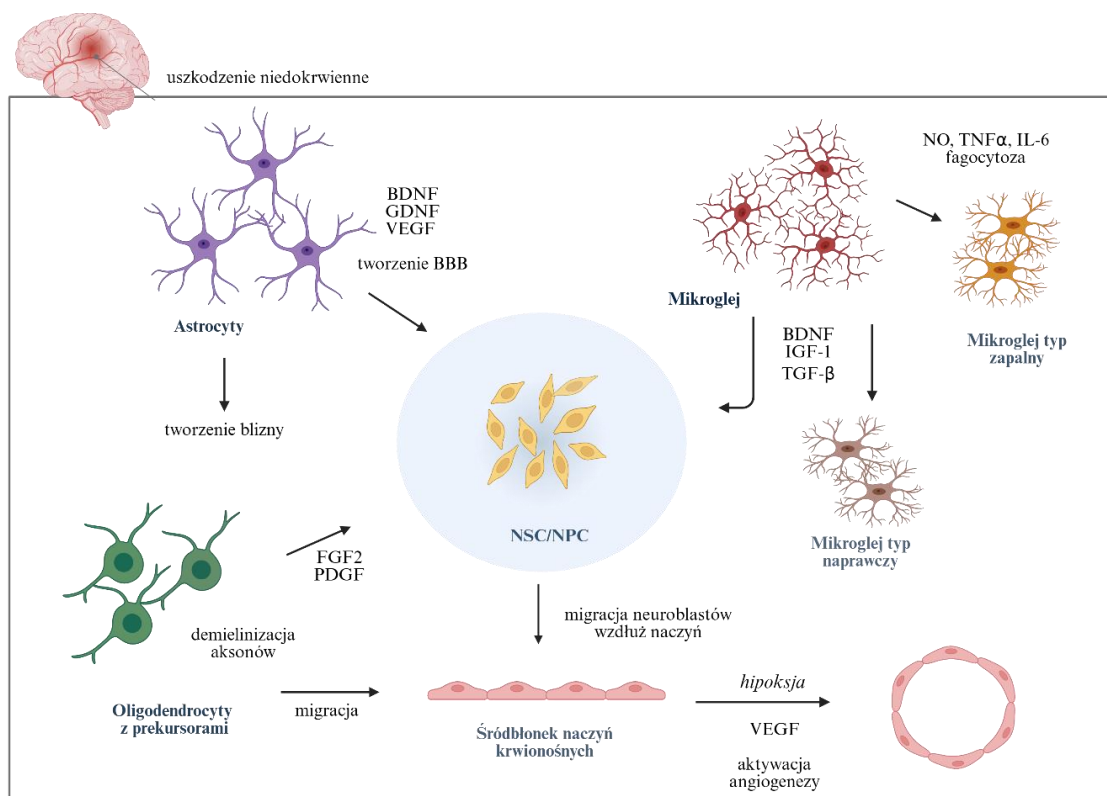
W przebiegu udaru niedokrwinnego dochodzi do hipoperfuzji tkankowej, co skutkuje miejscowym niedoborem tlenu i glukozy. W konsekwencji następuje wyczerpanie zasobów energetycznych oraz niezbędnych składników odżywczych, co zaburza prawidłowy metabolizm i zagraża przeżyciu komórek [38]. Towarzyszy temu destabilizacja gradientów osmotycznych, wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia oraz uszkodzenie integralności błon mitochondrialnych. Zaburzenie funkcji błonowej pompy sodowo-potasowej oraz uszkodzenie BBB prowadzą do rozwoju obrzęku cytotoksycznego, co z kolei nasila procesy martwicy i apoptozy w ognisku udaru. W odpowiedzi dochodzi do nadmiernego wytwarzania reaktywnych form tlenu (ROS), masowego uwalniania glutaminianu, akumulacji jonów wapnia wewnątrz komórek oraz aktywacji odpowiedzi zapalnej. W dalszych etapach niedokrwienia mózgu indukuje wzmożoną ekspresję genów zaangażowanych w mechanizmy apoptyczne, takich jak *p53*, *bcl-x* oraz *bax* (Rycina 3) [39,40].



Rycina 3 Kaskada zdarzeń po udarze niedokrwiennym mózgu. Skróty: ATP- adenozyntrifosforan, ROS – reaktywne formy tlenu, TNF α – czynnik martwicy nowotworu α , MCP-1 - białko chemotaktyczne monocytów 1, ICAM-1 - międzykomórkowa molekula adhezyjna 1. Rycina stworzona przy użyciu programu BioRender.com.

W odpowiedzi na uraz komórki niszy przystępują do odbudowy uszkodzonej tkanki. Dochodzi do aktywacji astrocytów, dzięki czemu rozpoczynają one tworzenie bariery wokół ogniska udaru tym samym ograniczając jego rozrost. Dodatkowo wydzielają szereg czynników o działaniu neuroprotektynym takich jak BDNF, GDNF czy VEGF.

Równie istotną rolę w odbudowie mikrośrodowiska po udarze odgrywają naczynia krwionośne. Ma to związek m.in. z ich funkcją w utrzymaniu integralności BBB. Prawidłowe funkcjonowanie BBB jest zależne od połączeń szczelinowych pomiędzy komórkami śródbłonna i mikrośrodowiskiem okołonaczyniowym. W ostrej fazie po rozpoczęciu niedokrwienia dysfunkcja NVU bezpośrednio prowadzi do przerwania BBB. Zmniejszenie ekspresji niektórych białek (takich jak okludyna, kładyna-5 i ZO-1) zwiększa przepuszczalność BBB i zwiększa ryzyko wywołania wazogennej obrzęku mózgu. Perycyty natomiast mogą promować rozwój obrzęku mózgu, przekształcając się w typ prozapalny [41]. Ponadto migrują one do zmian urazowych w celu promowania regeneracji BBB, dzięki sygnalizacji PDGFR- β . Po udarze naczynia krwionośne zaczynają się regenerować, a miejscowy zawał sprzyja angiogenezie lecz proces ten jest powolny. W przypadku mózgu kluczowe jest, aby naprawa nastąpiła jak najszybciej po urazie, co wymaga terapii, która może wspierać ten proces [42]. Mikroglej natomiast pełni funkcje immunomodulacyjne jednak jak pokazują badania, często jego aktywacja sprzyja niekorzystnym procesom. Zmienione środowisko niszy prowadzi do natychmiastowej aktywacji mikrogleju w niszy i nieprawidłowej odpowiedzi neurogenicznej, z zatrzymaniem cyklu komórkowego NSC oraz NPC i śmiercią neuroblastów [43]. W przypadku oligodendrocytów podczas niedotlenienia dochodzi również do zaburzeń demielinizacji i mielinizacji co poważnie wpływa na funkcjonowanie, strukturę, metabolizm oraz przeżywalność aksonów [44] (Rycina 4). Dlatego też istotne jest jak najszybsze przywrócenie ich funkcjonalności.



Rycina 4 Schemat interakcji zachodzących pomiędzy NSC a komórkami zrębu podczas uszkodzenia niedokrwiennego mózgu. Rycina stworzona przy użyciu programu BioRender.com.

Uszkodzenie komórek wspierających niszę NSC powoduje, że konieczne staje się poszukiwanie elementów zdolnych do funkcjonalnego zastąpienia lub wzmocnienia mechanizmów ochronnych NVU i niszy w warunkach patologicznych. Odpowiednim kandydatem mogącym podjąć funkcje wspierające odbudowę wydają się mezenchymalne komórki macierzyste/ zrębowe (MSC). Choć fizjologicznie nie występują one w mózgu, dostarczenie ich do miejsca urazu ze względu na ich unikatowe właściwości wydaje się być potencjalnym rozwiązaniem na przyspieszenie regeneracji w mózgu.

Mezenchymalne komórki macierzyste/ zrębowe pozyskane z galarety Whartona (WJ-MSC)

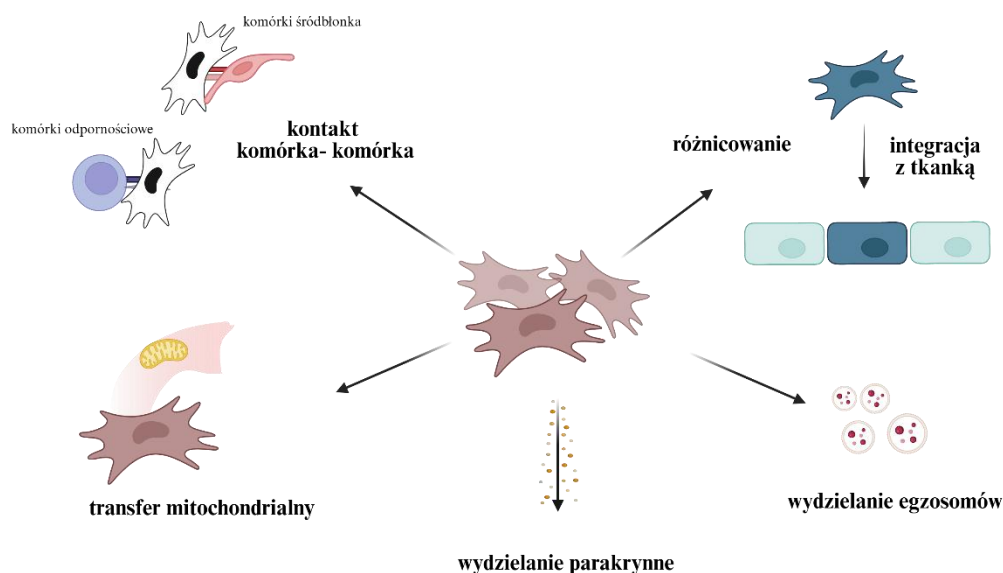
Mezenchymalne komórki macierzyste/ zrębowe (MSC – *ang. mesenchymal stem/ stromal cells*) zostały scharakteryzowana przez Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej i Genowej (ISCT – *ang. International Society for Cell & Gene Therapy*), które opracowało wytyczne dotyczące MSC. Wprowadzono nazwę „multipotencjalne mezenchymalne komórki zrębowe” i określono trzy minimalne kryteria: adhezję do plastiku; wykazywanie antygenów powierzchniowych: CD73+, CD90+, CD105+, CD34-, CD45-, CD11b-, CD14-, CD19-, CD79a-

i HLA-DR- oraz zdolność do różnicowania in vitro w osteoblasty, chondrocyty i adipocyty [45,46]. Aby określić komórki mianem „macierzyste” warto wykazać, że posiadają zdolności do samoodnowy, dlatego też MSC często określane są mianem „komórki macierzyste/ zrębowe”. Ze względu na szereg różnic we właściwościach MSC trwają próby rozszerzenia tych kryteriów o kolejne markery, aby mocniej ujednolicić tę grupę komórek lecz jest to niezwykle trudne ze względu na ich heterogeniczny charakter [47].

MSC mogą ingerować w procesy zachodzące w organizmie poprzez interakcje z innymi składnikami mikrośrodowiska zarówno lokalnego, jak i posiadają zdolność do migracji i chemotaksji do środowiska objętego stanem zapalnym. Komórki te mogą komunikować się z niszą za pomocą wielu mechanizmów (*Rycina 5*). Jednym z nich jest kontakt komórka – komórka. Najczęściej MSC komunikują się w ten sposób z makrofagami wpływając na ich polaryzację. Kolejnym istotnym mechanizmem interakcji komórkowych wykorzystywanym przez MSC jest tworzenie nanotubul. Jednym z kluczowych elementów przenoszonych przez nanotubule są mitochondria. Ich transfer pomiędzy komórkami pozwala na włączenie zdrowych mitochondriów do endogennej sieci komórek biorcy, co może wpływać na jej bioenergetykę oraz inne właściwości funkcjonalne. Taki proces może wspomagać regenerację komórek po procesach apoptotycznych i umożliwiać powrót do prawidłowego funkcjonowania. MSC są zdolne do tworzenia nanotubul i przekazywania przez nie mitochondriów oraz innych elementów do komórek docelowych, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i w przebiegu chorób prowadząc do zmian w metabolizmie energetycznym i funkcjach komórek [48].

MSC poprzez szereg właściwości tożsamy z komponentem zrębowym niszy neuralnych komórek macierzystych mogą stać się kluczowym elementem wspierającym odbudowę mózgu po uszkodzeniu (*Tabela 1*).

Jednymi z najważniejszych cech MSC są ich właściwości sekrecyjne i immunomodulacyjne. MSC posiadają zdolność wydzielania czynników aktywnych biologicznie w formie rozpuszczalnej oraz w postaci pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EV) w tym egzosomów, dzięki czemu są w stanie wchodzić w interakcje zarówno pośrednie jak i bezpośrednie z innymi komórkami w mikrośrodowisku. Komunikacja za pośrednictwem egzosomów głównie dotyczy przenoszenia białek, funkcjonalnego mRNA, miRNA i lipidów [49]. W szczególności miRNA obecne w EV mogą regulować od 30% do 70% ekspresji genów [50]. Sekretom rozpuszczalny MSC zawiera zarówno czynniki wzrostu (bFGF, HGF, BDNF, bNGF, GDNF, EGF), interleukiny i chemokiny (m.in. CCL2, IL-2, IL-1, IL-6, IL-10) oraz hormony i cząstki sygnałowe [51].



Rycina 5 Rodzaje interakcji mezenchymalnych komórek macierzystych/ zrębowych z pozostałymi składnikami mikrośrodowiska. Rycina stworzona przy użyciu programu BioRender.com.

Wszystkie te elementy są zaangażowane w modulację lokalnego mikrośrodowiska a także w migrację do miejsc objętych stanem zapalnym lub urazem. MSC są wrażliwe na zmiany w organizmie a aktywny stan zapalny wpływa na ich aktywność i funkcje. Udowodniono, że stan zapalny pełni kluczową rolę w pośredniczeniu w funkcjach MSC, a komórki zrębowe wyczuwają uszkodzenia i inicjują naprawę tkanek poprzez przeprogramowanie środowiska zapalnego [52,53].

MSC w odpowiedzi na stan zapalny zmieniają swój profil wydzielniczy, tym samym modulując mikrośrodowisko. MSC wykazują również działania o efekcie przeciwzapalnym, które obejmują m.in. wpływ na właściwości chemotaktyczne komórek B [54], tłumienie aktywacji komórek NK indukowanej interleukiną-2 (IL-2) [55] oraz wpływają na funkcje monocytów, komórek dendrytycznych, obniżając poziom receptorów aktywujących NK i makrofagi [54]. MSC modulują komórki odpornościowe poprzez zakłócanie ich aktywacji, proliferacji, dojrzewania, aktywności cytolitycznej, produkcji cytokin lub przeciwciał [56]. OUN i jego bariery są pełne wrodzonych i adaptacyjnych komórek odpornościowych, które oddziałują z glejem w chorobach. Wykazano, że interakcje między komórkami odpornościowymi a glejami odgrywają kluczową rolę w zdolności regeneracyjnej OUN [57]. Wpływ MSC na komórki odpornościowe może uczestniczyć w interakcjach między komórkami odpornościowymi a glejem, a następnie wpływać na regenerację OUN.

MSC pozyskiwane są z wielu tkanek dorosłego organizmu takich jak szpik kostny, tkanka tłuszczowa, miazga zębowa, rąbek rogówki oka, trzustka czy wątroba oraz tkanek płodu [58–60]. Wśród różnych źródeł MSC, szczególnie obiecującym jest galareta Whartona (WJ-MSC).

Galareta Whartona jest międzynaczyniową częścią sznura pępowiny. Subramanian i współautorzy przeprowadzili porównanie różnych populacji komórek wyizolowanych z poszczególnych części pępowiny. Wykazali, że galareta Whartona jest najbogatszym źródłem MSC, a komórki pozyskane z tego obszaru charakteryzują się najwyższym potencjałem proliferacyjnym. Co więcej, WJ-MSC wyizolowane z tego rejonu wykazywały w długoterminowej hodowli największą przeżywalność oraz najwyższą aktywność telomerazy spośród wszystkich analizowanych struktur sznura pępowinowego [61]. Co więcej WJ-MSC w porównaniu do MSC pozyskanych z innych źródeł w dorosłym organizmie m.in. tkanki tłuszczowej (ADSC) czy szpiku kostnego (BM-MSC) charakteryzowały się wyższym potencjałem proliferacyjnym oraz zwiększoną aktywnością parakrynną [59]. Niektóre badania wykazały, że WJ-MSC wydzielają większe ilości czynników angiogennych, takich jak VEGF i FGF-2, oraz mają większą zdolność do tworzenia struktur przypominających kapilary w warunkach *in vitro*. Może to świadczyć o ich wyższym potencjale proangiogennym. Ponadto interakcje WJ-MSC z komórkami śródbłonna mogą odgrywać istotną rolę w procesie regeneracji tkanki mózgowej po udarze niedokrwinnym, wspierając odbudowę mikrokrążenia oraz przywracanie funkcji BBB. Wykazano ich potencjał neuroprotektoryjny, który został określony po pośredniej współhodowli WJ-MSC z uszkodzonymi komórkami neuronalnymi lub tkanką nerwową szczura [62,63]. Obserwowano zdolności WJ-MSC do wspomagania regeneracji nerwów obwodowych. W badaniach na modelu szczurzym po podaniu WJ-MSC wykazano wzrost czynników BDNF, VEGF i NGF co przyczyniło się do przyspieszenia regeneracji nerwu obwodowego. Dodatkowo zaobserwowano zwiększoną ilość szczurzych komórek Schwanna [64]. Badania pokazują, że immunomodulacja i działania parakrynnie WJ-MSC przyczyniają się do regeneracji nerwów obwodowych bardziej niż ich potencjał różnicowania.

Tabela 1 Funkcje komórek podporowych w niszy oraz ich potencjalne wsparcie przez MSC.

Typ komórek	Funkcja w OUN	Potencjalne wsparcie przez MSC
Astrocyty	Wydzielanie czynników wzrostu (np. BDNF, VEGF, FGF2)- „opiekunowie” KM; Modulacja stanu spoczynkowego NSC; Regulacja dostępu do składników odżywczych i tlenu; Alternatywne źródło progenitorów neuronalnych	Aktywność parakrynną: wydzielanie BDNF, VEGF, FGF2
Oligodendrocyty	Aktywność parakrynną wpływająca na NSC (BDNF, NGF); Wpływ na różnicowanie komórek progenitorowych w kierunku neuronalnym lub glejowym	Aktywność parakrynną (BDNF, NGF)
Ependymocyty	Wyściółka ściany komór bocznych; Element tworzący barierę między płynem mózgowo-rdzeniowym a niszą; Wydzielanie cząsteczek sygnałowych (m.in. Wnt, Shh) - regulacja proliferacji NSC; Utrzymanie cytoarchitektury niszy	Pośrednie wspomaganie funkcji, wydzielanie czynników parakrynnych i enzymów remodelujących ECM (ułatwienie dyfuzji sygnałów w obrębie niszy)
Mikroglej	Regulator immunologiczny niszy; Usuwanie obumarłych komórek; Wydzielanie cytokin o działaniu wspierającym lub hamującym neurogenezę w zależności od obecności stanu zapalnego	Silne właściwości immunomodulacyjne — wydzielanie m.in. TGF- β , IL-10 oraz PGE2 (przesunięcie mikrogleju w kierunku fenotypu naprawczego)
Perycyty oraz Śródbłonek Naczyń Krwionośnych	Stabilizacja bariery krew–mózg dostarczanie czynników troficznych (np. VEGF); Promocja angiogenezy; Element pośredniczący w wymianie czynników i substancji odżywczych pomiędzy tkanką mózgową a krwią	Aktywność parakrynną: PDGF, VEGF i TGF- β (poprawa stabilności i przepuszczalności naczyń w niszy) Obecność glikoproteiny CD146 biorącej udział w procesach angiogenicznych

WJ-MSC dzięki swoim wielokierunkowym właściwościom wydają się być dobrym kandydatem na komórki wspierające regenerację OUN. Mogą one migrować do uszkodzonych obszarów mózgu, gdzie wywołują efekty neuroprotektoryjne i angioprotektoryjne [65–67], mogą promować regenerację komórek w uszkodzonej korze mózgowej, a ich sekretom ma korzystny wpływ na neurony po urazie mózgu [68,69]. Istotne jest dokładne zrozumienie mechanizmów działania WJ-MSC w warunkach niedokrwienia oraz ich potencjalnych zastosowań terapeutycznych. Pomimo obiecujących wyników badań dotyczących właściwości WJ-MSC,

mechanizmy ich oddziaływania ze strukturami neuro-naczyniowymi wciąż pozostają nie do końca wyjaśnione. W szczególności, interakcje WJ-MSc z komórkami śródbłónki oraz ich odpowiedź na bodźce niedokrwienne wymagają dalszych analiz. Dotychczasowe obserwacje wskazują, że komórki te mogą wspierać angiogenezę i stabilizację mikrokrazenia poprzez wydzielanie czynników parakrynnych, takich jak VEGF czy HGF, jednak brak jednoznacznych dowodów na to, czy i w jaki sposób aktywują komponent naczyniowy niszy mózgu. Tymczasem to właśnie precyzyjna aktywacja tej składowej może być kluczowa dla skutecznego uruchomienia endogennych procesów regeneracyjnych po udarze. Potwierdzenie wyżej wymienionych mechanizmów mogłoby otworzyć drogę do nowych podejść terapeutycznych– opartych na ukierunkowanym podaniu WJ-MSc lub na właściwościach wydzielniczych– w określonym czasie i miejscu, co zwiększyłoby skuteczność terapii i bezpieczeństwo kliniczne. Co więcej, WJ-MSc wydają się być dobrym kandydatem, aby stworzyć funkcjonalne mikrośrodowisko i poprawić skuteczność terapeutyczną NSC. Dotychczas nie ma jednoznacznych dowodów w jaki sposób MSc mogą oddziaływać z NSC lub ich niszą w celu zwiększenia zdolności regeneracyjnych NSC do różnicowania w dojrzałe i funkcjonalne neurony. Same MSc i NSC mają niskie zdolności regeneracyjne w OUN, ale ich unikalne cechy mogą stworzyć synergiczną relację, która jest kluczowa dla wzmocnienia efektu terapeutycznego. Podczas gdy NSC mogłyby dostarczać nowych progenitorów neuronalnych, a WJ-MSc mogłyby immunoprzywilejować mikrośrodowisko i wspierać przetrwanie oraz różnicowanie nowo powstałych neuroblastów oraz innych czynników podporowych poprzez efekt adiuwantowy i kontakt międzykomórkowy oraz wspierać BBB.

Cele pracy

Celem pracy było zbadanie roli mezenchymalnych komórek macierzystych/zrębowych (WJ-MSC) w kształtowaniu interakcji w niszy neuralnych komórek macierzystych (NSC) *in vitro*, ze szczególnym uwzględnieniem zmian zachodzących w MSC ukierunkowanych na wspieranie innych subpopulacji komórek, takich jak progenitory endotelialne oraz prekursorzy komórek neuralnych (NSC/NPC).

Cele szczegółowe

Cel I: Ocena wpływu czynników środowiskowych na podstawowe parametry WJ-MSC

Analiza wpływu czynnika środowiskowego, jakim jest dostępność składników odżywczych na proliferację, migrację, profil sekrecyjny oraz zdolności adaptacyjne WJ-MSC, w celu oceny ich funkcji wspierających mikrośrodowisko niszy komórkowej.

Cel II: Ocena wzajemnych oddziaływań WJ-MSC z komórkami śródbłónka naczyń krwionośnych

Badanie interakcji WJ-MSC z komórkami śródbłónka, które stanowią krytyczny element utrzymania homeostazy w niszy komórkowej oraz inicjacji mechanizmów naprawczych i regulacyjnych w odpowiedzi na uszkodzenie.

Cel III: Ocena wpływu obecności NSC/NPC na WJ-MSC

Analiza wpływu neuralnych komórek macierzystych/progenitorowych (NSC/NPC) na profil sekrecyjny WJ-MSC sprzyjający utrzymaniu niszy komórkowej oraz procesów regeneracyjnych po urazie.

Materiały i metody

MODELE IN VITRO

1. Izolacja i hodowla WJ-MSC

Mezenchymalne komórki macierzyste/ zrębowe zostały wyizolowane z galarety Whartona będącej częścią sznura pępowinowego. Materiał pozyskano z Kliniki Położnictwa i Ginekologii Szpitala Klinicznego Dzieciątka Jezus w Warszawie, po uzyskaniu świadomych zgód od matek. Pobranie i wykorzystanie pępowiny odbywało się zgodnie z wytycznymi Lokalnej Komisji Bioetycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego (nr zgody: KB/213/2016).

Fragment pępowiny o długości ok. 10 cm został pobrany podczas porodu do roztworu soli fizjologicznej buforowanej fosforanem (PBS, ang. Phosphate Buffered Saline, Gibco) z dodatkiem 1% mieszaniny antybiotyków: penicyliny, streptomycyny oraz amfoterycyny B (AAS- ang. *antibiotic/ antimycotic solution*, Merck Life Science). Następnie tkanka została przetransportowana do Platformy Badań Translacyjnych w zakresie Medycyny Regeneracyjnej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie. Do badań wykorzystano mechaniczną metodę izolacji WJ-MSC. Pępowinę pokrojono w płaszczyźnie poprzecznej na fragmenty grubości ok. 2-3 mm. Następnie, przy pomocy narzędzia biopsyjnego (Miltex, GmbH), z każdego plastra wycięto fragmenty galarety Whartona (tkanki łącznej) o średnicy 2 mm. Otrzymane eksplanty przeniesiono na płytkę hodowlaną 6-dołkową, po 5 fragmentów na dołek i hodowano w pożywce wzrostowej DMEM (Gibco) z dodatkiem 5% lizatu płytkowego (PLTGold®, MillCreek Life Sciences) oraz 1% AAS. Hodowlę prowadzono przez 10-14 dni w 37°C, 5% CO₂, przy wilgotności 95%, w warunkach fizjologicznego stężenia tlenu (5% O₂). Po tym czasie resztki eksplantów zostały usunięte a komórki, które wymigrowały z fragmentów galarety Whartona zostały przepłukane PBS, odklejone przy użyciu akutazy i przepasazowane do nowych naczyń hodowlanych w proporcji 2000 komórek/cm², w pożywce wzrostowej. Do eksperymentów używano komórek z pasaży 3-6.

2. Charakterystyka WJ-MSC

2.1. Analiza markerów mezenchymalnych metodą cytometrii przepływowej

Analizę ekspresji markerów powierzchniowych charakterystycznych dla MSC wykonano z zastosowaniem cytometrii przepływowej używając dedykowanego dla komórek macierzystych gotowego zestawu mysich przeciwciał skierowanych przeciwko ludzkim antygenom t.j. CD90-FITC, CD105- PerCP- Cy™, CD70- APC oraz CD44- PE (Human MSC Analysis Kit, BD Bioscience). Wszystkie procedury znakowania zostały wykonane zgodnie z załączonym protokołem doświadczenia. Następnie próby poddano analizie w cytometrze przepływowym FACSCanto II (Becton Dickinson, USA) z użyciem oprogramowania FASCDiva. Analizę

wyników przeprowadzono z użyciem oprogramowania FlowJo (FlowJo software 10v8.1). Wyznaczono procentowy udział komórek wykazujących na swojej powierzchni oznaczane markery w całkowitej populacji WJ-MSC (analizowano nie mniej niż 10 000 komórek).

2.2. Ocena potencjału mezodermalnego WJ-MSC

Do weryfikacji zdolności komórek WJ-MSC do różnicowania w kierunku mezodermalnym wykorzystano zestaw komercyjnych mediów indukujących różnicowanie – STEMPRO® Adipogenesis/ Osteogenesis/ Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco). Procedury adipogenezy, osteogenezy i chondrogeneyz wykonano zgodnie z zaleceniami producenta. Komórki wysiano na szalki 24-dółkowe w gęstości 2×10^3 komórek/cm², następnie hodowano do konfluencji 50-70% dla osteo- i adipogenezy) i wymieniano standardowe medium hodowlane na odpowiednią pożywkę różnicującą. W przypadku chondrogeneyz komórki pobrano z osadu komórkowego i wysiano w postaci 5µl peletu na szalkę 24- dółkową. Pelet suszono przez 30 minut w inkubatorze do hodowli komórkowej (37° C, 5% CO₂, 5% O₂, 95 % wilgotności) a następnie dodano pożywkę różnicującą odpowiednią dla chondrogeneyz. Komórki podczas różnicowania hodowane były w inkubatorze w 21% O₂, 5% CO₂, 95% wilgotności. Różnicowanie w kierunku adipocytów oraz chondrocytów prowadzono przez 14 dni natomiast w kierunku osteocytów 21 dni. Po tym czasie komórki utrwalono za pomocą 4% PFA (Sigma-Aldrich) a następnie odpowiednio barwiono w celu weryfikacji (Tabela 2).

Tabela 2 Warunki różnicowania komórek wraz z metodą weryfikacji powodzenia adipogenezy, osteogenezy oraz chondrogeneyz.

	Adipogeneza	Osteogeneza	Chondrogenza
Wysiana gęstość komórek	2x10 ³ komórek/cm ²	2x10 ³ komórek/cm ²	5µl peletu komórkowego
Typ hodowli	standardowa	standardowa	pelet
Pożywka różnicująca	STEMPRO® Adipogenesis Differentiation Kit	STEMPRO® Osteogenesis Differentiation Kit	STEMPRO® Chondrogenesis Differentiation Kit
Czas różnicowania	14 dni	21 dni	14 dni
Sposób weryfikacji procesu różnicowania	Barwienie czerwienią oleistą kropli tłuszczu w cytoplazmie	Barwienie czerwienią alizarynową S soli wapnia	Barwienie błękitem alcjanowym glikozaminoglikanów tkanki chrzęstnej

Adipogeneza. Utrwaloną hodowlę WJ-MSC płukano wodą destylowaną oraz 60% roztworem izopropanolu, po czym dodano czerwieni olejowej (3 mg/ml w mieszaninie izopropanol/woda 3:2) i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Za pozytywny wynik uznawano wybarwione czerwienią oleistą krople tłuszczu obecne w komórkach.

Chondrogeneza. Pozytywną chondrogenezę potwierdzono z użyciem błękitu alcjanu na obecność glikozaminoglikanów tkanki chrzęstnej. W tym celu, przygotowane wcześniej komórki wybarwiano 1% roztworem błękitu alcjanu (Alcian Blue, Sigma- Aldrich) w 0,1N HCl i inkubowano 30 minut w RT. Następnie, nadmiar barwnika odpłukano 0,1N HCl i zneutralizowano wodą destylowaną.

Osteogeneza. Komórki po utrwaleniu przepłukano wodą dejonizowaną, a następnie inkubowano przez 3 minuty w temperaturze pokojowej z 2% roztworem czerwieni alizarynowej S (Alizarin Red S, Sigma- Aldrich). Barwnik ten uwidacznia na czerwono sole wapnia wytworzone przez osteoblasty.

2.3. Ocena potencjału klonogennego WJ-MSC

Potencjał klonogeny WJ-MSC oceniono licząc utworzone ośrodki proliferacji CFU-F (ang. Colony-Forming Units). W tym celu komórki podczas pasaży policzono i wysiano po 10 komórek na dołek szaliki 6- dołkowej. WJ-MSC hodowano w pożywce podstawowej DMEM (Gibco) z dodatkiem lizatu płytkowego (PLTGold®, MillCreek Life Sciences; 3% lub 10%) oraz 1% AAS (Gibco). Hodowlę prowadzono przez 10- 14 dni w 37°C, 5% CO₂, przy wilgotności 95%, w warunkach fizjologicznego stężenia tlenu (5% O₂). Po tym czasie komórki utrwalono 4% PFA, odpłukano buforem PBS i wybarwiono 0,5% roztworem błękitu toluidyny. Następnie zliczono utworzone centra proliferacyjne i wyliczono ich procentowy udział wg wzoru:

$$CFU = \frac{\text{liczba utworzonych centrów proliferacyjnych}}{\text{liczba komórek wysianych na dołek}} * 100\%$$

3. Analiza migracji w środowisku o różnej zawartości czynników odżywczych

W celu porównania migracji w środowisku o niskiej (3%) i wysokiej (10%) zawartości czynników odżywczych wykonano klasyczny test rysy. WJ-MSC hodowano na płytkach 24- dołkowych. Po osiągnięciu konfluencji 80% wykonano rysę za pomocą końcówki do pipety wielkości 200 µl. Dołek przepłukano buforem PBS, a następnie dodano pożywkę wzrostową z odpowiednim stężeniem hPL (3% lub 10%). Następnie prowadzono obserwację w punktach czasowych : 0 h, 2 h, 4 h, 6 h wykonując zdjęcia obszaru rysy z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego Zeiss Axio Vert.A1. Analizę obrazu przeprowadzono z użyciem programu ZEN. Migrację wyrażono jako procent obszaru rysy pokrytego przez komórki migrujące:

$$\% \text{ migracji} = \frac{\text{powierzchnia pokryta w czasie } t}{\text{powierzchnia w punkcie czasowym } 0 \text{ h}} * 100\%$$

4. Analiza proliferacji

Proliferację komórek oceniano z wykorzystaniem testu PrestoBlue® (Thermo Fisher Scientific). Komórki wysiewano na 96-dołkowej płytce do hodowli komórkowej w początkowej gęstości 3×10^3 komórek/cm². Analizę prowadzono przez 5 kolejnych dni. Każdego dnia analizy dodawano po 5 µL odczynnika PrestoBlue i inkubowano przez 1 godzinę. Następnie absorbancję mierzono przy użyciu czytnika testów immunoenzymatycznych (Spark 10M, Tecan, Männedorf, Szwajcaria). Liczbę komórek wyznaczono na podstawie wykonanej krzywej wzorcowej.

5. Analiza cyklu komórkowego

Cykl komórkowy podczas hodowli WJ-MSC w 3% i 10% stężeniu lizatu płytkowego w pożywce został oceniony z użyciem jodku propidyny (PI) i analizowany w cytometrze przepływowym. Po 5 dniach hodowli WJ-MSC przepłukano buforem PBS i utrwalono zawieszając w zimnym roztworze etanolu (70%). Następnie przechowywano w temperaturze 4°C do momentu analizy. Do barwienia utrwalone WJ-MSC odwirowano z etanolu, przepłukano PBS, a następnie barwiono roztworem: 10 µg/ ml PI (Sigma-Aldrich), 0,1 % Triton X- 100 (Sigma Aldrich) oraz 100 µg/ ml RNazy A (RNase A, Sigma-Aldrich) przez 30 minut w RT w ciemności. Komórki analizowano za pomocą cytometru przepływowego FACSCanto II (Becton Dickinson, USA) z oprogramowaniem BD FACSDiva. Akwizycji poddano nie mniej niż 1×10^4 komórek. Analizowano z wykorzystaniem programu FACSFlow.

6. Hodowla i charakterystyka komórek śródbłónka naczyń krwionośnych (HUVEC)

Jako komponent śródbłonkowy wykorzystano dostępne komercyjnie ludzkie komórki śródbłonkowe z żyły pępowinowej (HUVEC, *ang. Human Umbilical Vein Endothelial Cells*; Lonza, Bazylea, Szwajcaria). Komórki te hodowane były w dedykowanej pożywce EGM-2 (*ang. Endothelial Growth Medium- 2*), w której skład wchodziła pożywka podstawowa EBM oraz suplement *Bullet Kit* (Lonza). Hodowlę prowadzono w 37°C, 5% CO₂, przy wilgotności 95%, w warunkach fizjologicznego stężenia tlenu (5% O₂). Morfologię komórek oceniano przy użyciu mikroskopu odwróconego AxioVert V (Zeiss).

Analiza zdolności do wychwytu deacetylowanych lipoprotein niskiej gęstości

Komórki wysiano na szalki 24- dołkowe pokryte poli-L-lizyną (PLL) i hodowano do uzyskania ok. 50- 60% konfluencji. Następnie komórki inkubowano z deacetylowaną lipoproteiną o niskiej gęstości znakowaną 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetrametyloindo-karbocyaniną perchloranową (dil-Ac-LDL; Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) w stężeniu 10 µg/ml w temperaturze 37°C przez 4 godziny. Dodatkowo, komórki zostały utrwalone 4% PFA, zabarwione Hoechst 33258 i obserwowane pod mikroskopem fluorescencyjnym (Axio Vert.A1; Carl Zeiss).

Analiza zdolności do tworzenia struktur naczyniopodobnych - tubularnych

W celu oceny zdolności badanych komórek do tworzenia struktur tubularnych wykorzystano 96- dołkowe płytki dedykowane analizie angiogenezy. Na dołki naniesiono 10 μ l matrigel (Corning) i inkubowano 30 min. w 37°C. Następnie na tak przygotowaną płytkę wysiano 10 000 badanych komórek. Po 24 godzinach hodowli oceniano morfologię komórek przy użyciu mikroskopu świetlnego AxioVert V (Zeiss).

7. Hodowla i charakterystyka ludzkich neuralnych komórek macierzystych (NSC/NPC)

Ludzkie NSC/NPC otrzymaliśmy z biobanku komórek ludzkich dzięki współpracy z grupą badawczą prof. A. Vescoviego (I.R.C.C.S. "Casa Sollievo Della Sofferenza", Włochy). Komórki hodowano w zawieszynie (neurosferę) w pożywce zawierającej: DMEM/F12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific), GlutaMAX[®] (1%, Gibco), penicylinę/streptomycynę (1%, Gibco), heparynę (0,1%, Sigma-Aldrich), suplement N2[®] (1%, Gibco), suplement B27[®] (2%, Gibco), EGF (20 ng/mL, Gibco), bFGF (20 ng/mL, Gibco). Neurosfery (hodowla 3D) zostały rozdrobnione mechanicznie, gdy osiągnęły pożądany rozmiar (100-150 μ m średnicy). Komórki w hodowli 2D były wysiewane na płytki 24-dołkowe pokryte lamininą, a do ich hodowli używano standardowej pożywki bez czynników wzrostu.

8. Analiza współhodowli komórkowych (WJ-MSC+ HUVEC oraz WJ-MSC+ NSC/NPC)

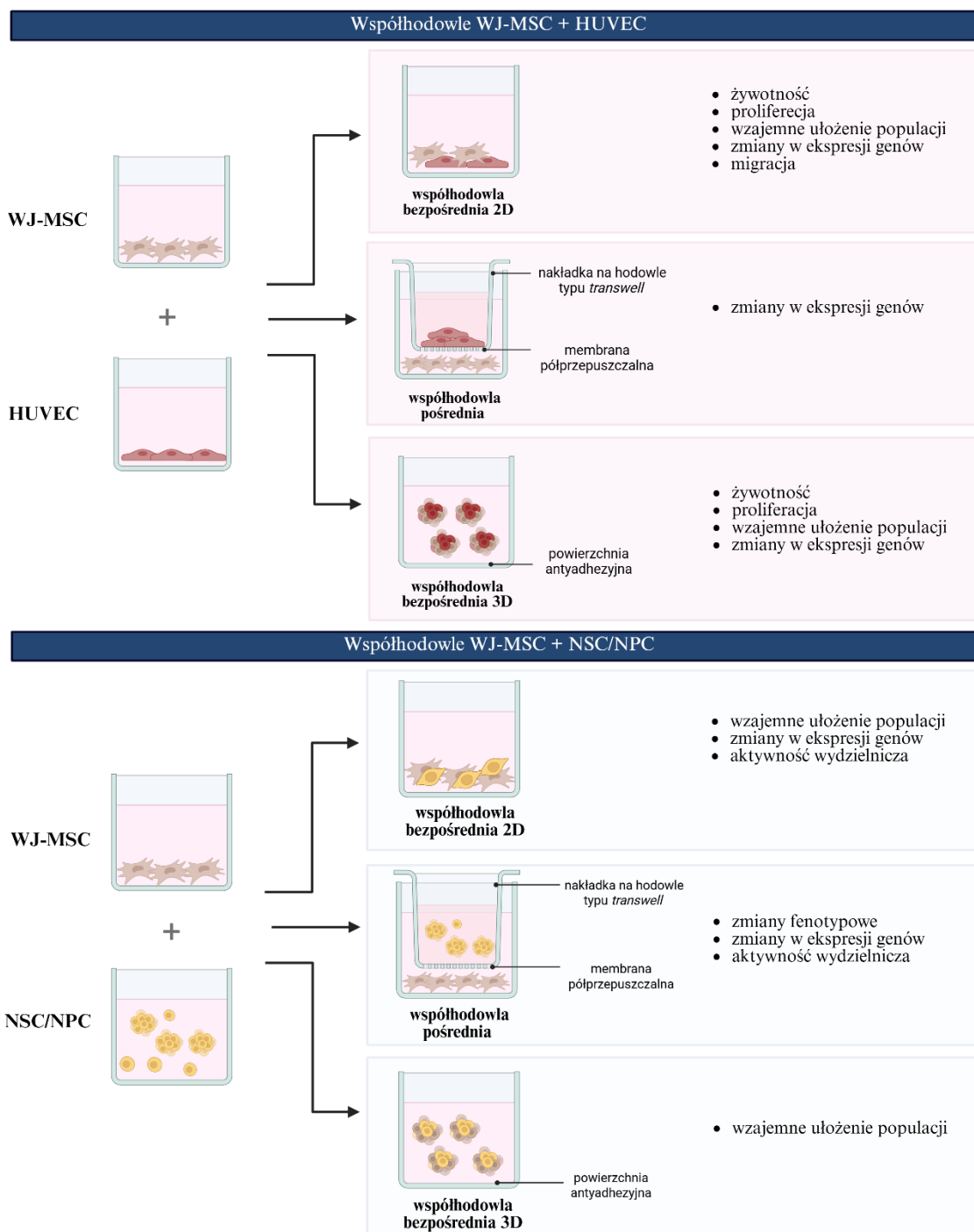
Do oceny wzajemnych interakcji pomiędzy poszczególnymi populacjami komórkowymi wykorzystano model współhodowli komórkowych w układach (Rycina 6):

Współhodowle bezpośrednie:

- Komórki mezenchymalne/stromalne i komórki endotelialne w monowarstwie: WJ-MSC z HUVEC 2D
- Komórki mezenchymalne/stromalne i komórki endotelialne w zawieszynie 3D WJ-MSC z HUVEC 3D
- Komórki mezenchymalne/stromalne i komórki neuralne w monowarstwie WJ-MSC z NSC 2D
- Komórki mezenchymalne/stromalne i komórki neuralne w zawieszynie 3D WJ-MSC z NSC 3D

Współhodowle pośrednie:

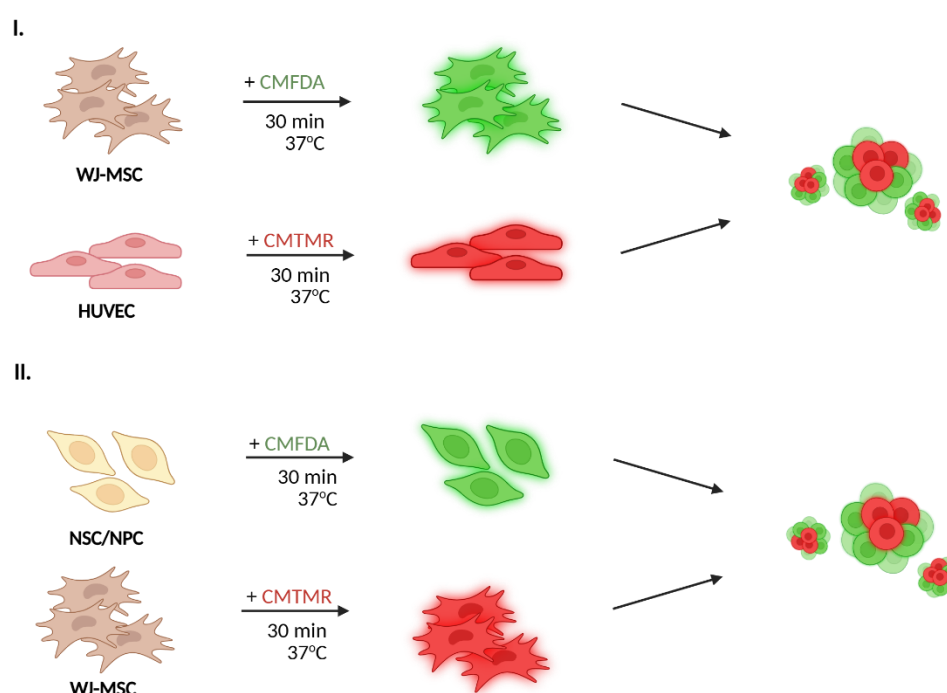
- Komórki mezenchymalne/stromalne i komórki endotelialne z wykorzystaniem membrany typu „transwell” (WJ-MSC z HUVEC)
- Komórki mezenchymalne/stromalne i komórki neuralne z wykorzystaniem membrany typu „transwell” (WJ-MSC z NSC)



Rycina 6 Schemat zakładania współhodowli bezpośredniej 2D, pośredniej oraz bezpośredniej 3D WJ-MSC + HUVEC, a także WJ-MSC + NSC/NPC. Rycina stworzona przy użyciu programu BioRender.com.

8.1. Barwienie przyżyciowe komórek

W celu wizualizacji lokalizacji różnych populacji komórek we współhodowli użyto znakowania przyżyciowego bazującego na fluorescencji. Komórki we współhodowli zostały zobrazowane użyciem 10 mM zielonego barwnika CMFDA (Abcam) dla WJ-MSC lub NSC/NPC oraz pomarańczowego barwnika CMTMR (Abcam) dla HUVEC. W tym celu podczas pasażu komórek odpowiedni barwnik dodano do pożywki i inkubowano 30 minut w 37°C. Następnie obie populacje komórek zostały wysiane do dołka o powierzchni nieprzylegającej (*Rycina 7*). Analizę komórek przeprowadzono po 3 dniach za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, korzystając z mikroskopu fluorescencyjnego Zeiss Axiovert A.1 (Carl Zeiss).



Rycina 7 Schemat barwienia przyżyciowego komórek z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych. I - Barwienie i tworzenie współhodowli WJ-MSC oraz HUVEC; II - Barwienie i tworzenie współhodowli WJ-MSC oraz NSC/NPC. Rycina stworzona przy użyciu programu BioRender.com.

8.2. Barwienie immunofluorescencyjne

Komórki wysiano na szkiełka mikroskopowe pokryte poli-L-lizyną, umieszczonych w 24-dółkowej płytce hodowlanej i hodowano do 70–80% konfluencji. Następnie WJ-MSC/ HUVEC/ NSC/NPC utrwalono przy użyciu 4% paraformaldehydu (PFA), oraz przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne z zastosowaniem przeciwciał w celu wizualizacji wybranych markerów. Utrwalone komórki poddano permeabilizacji, inkubując je przez 15 minut w 0,1% roztworze Triton X-100 (Sigma-Aldrich). Aby zablokować niespecyficzne miejsca wiązania przeciwciał drugorzędowych, zastosowano mieszaninę 10% roztworu surowicy koźlęcej (GS, *ang.* goat serum,

Capricorn Scientific) i 1% albuminy bydlęcej (BSA- *ang.* bovine serum albumin), inkubując preparaty przez 1h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie naniesiono przeciwciała pierwszorzędowe (Tabela 3) i inkubowano przez całą noc w temperaturze 4°C. Po inkubacji preparaty przepłukano roztworem PBS, a następnie dodano przeciwciała II-rzędowe (w rozcieńczeniu 1:1000), znakowane fluorochromami: Alexa Fluor 488 (zielony, Invitrogen) oraz Alexa Fluor 546 (czerwony, Invitrogen). Inkubację prowadzono przez 60 minut w temperaturze pokojowej. Preparaty zostały zabezpieczone za pomocą medium do utrwalania próbek fluorescencyjnych zawierającego barwnik DAPI (Fluoromount-G™ Mounting Medium, ThermoFisher Scientific). Obserwacji dokonano przy użyciu mikroskopu konfokalnego LSM (Carl Zeiss, Niemcy), wykorzystując oprogramowanie Zen 2.0 (Carl Zeiss).

Tabela 3 Przeciwciała wykorzystane w barwieniach immunofluorescencyjnych w badaniach *in vitro*.

Przeciwciało	Pochodzenie	Izotyp	Rozcieńczenie	Producent
KI67	królicze poliklonalne	IgG (H+L)	1:1000	Biolegend
VEGFR1	królicze poliklonalne	IgG (H+L)	1:100	ThermoFisher
VEGFR2	mysie monoklonalne	IgG1	1:100	ThermoFisher
Wimentyna	mysie monoklonalne	IgG1	1:200	Merck
Nestyna	mysie monoklonalne	IgG1	1:500	Merck
Fibronektyna	królicze poliklonalne	IgG (H+L)	1:400	Sigma Aldrich
GFAP	królicze poliklonalne	IgG (H+L)	1:500	Dako
A2B5	mysie monoklonalne	IgM	1:200	Merck

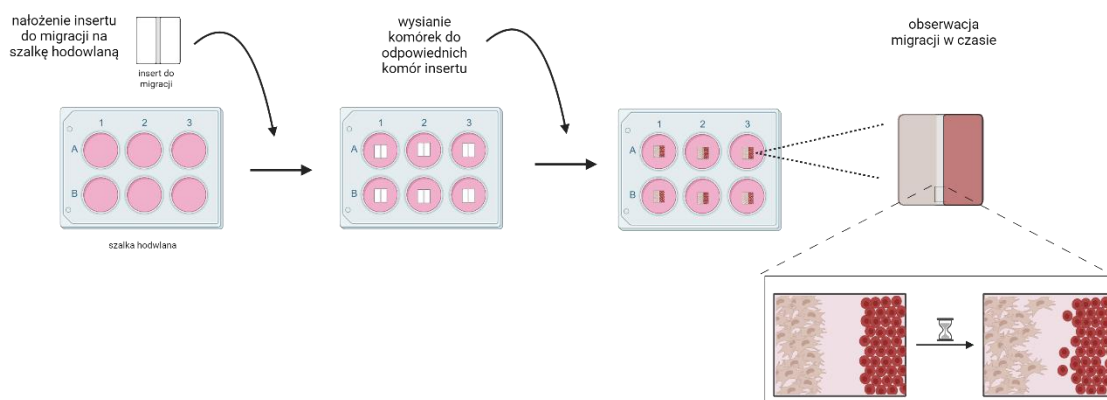
8.3. Test oceny żywotności komórek

W celu oceny żywotności komórek w stworzonych współhodowlach komórki wybarwiono z wykorzystaniem zestawu LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). W badaniu tym odróżniono żywe komórki od martwych poprzez jednoczesne

barwienie kalceiną (zielona fluorescencja) w celu wskazania wewnątrzkomórkowej aktywności esterazy – komórki żywe i homodimerem etydyny (czerwona fluorescencja)- wskazanie utraty integralności błony plazmatycznej. Wszystkie procedury zostały wykonane według protokołu producenta.

8.4. Test migracji

Do analizy migracji poszczególnych populacji komórek względem siebie wykorzystano test rysy z użyciem komercyjnie dostępnych dwukomorowych wkładów umożliwiających miarodajną ocenę migracji populacji komórek (Culture-Insert 2 Well, ibidi). Zgodnie z zaleceniami producenta wkładki zostały umieszczone w naczyniu hodowlanym a następnie do każdej z komór zostały nasiane komórki w gęstości: WJ-MSC: 10 000 komórek/komorę; HUVEC: 15 000 komórek/komorę. Po 24 godzinach wkłady zostały usunięte z naczynia hodowlanego, dodano świeżą pożywkę hodowlaną i rozpoczęto obserwację. W celu określenia tempa wzajemnej migracji wykonywano zdjęcia w punktach czasowych 0, 2, 4, 6 h i porównywano % wolnego obszaru rysy (*Rycina 8*).



Rycina 8 Schemat przygotowania komórek do analizy wzajemnej migracji z wykorzystaniem dwukomorowego insertu. Rycina stworzona przy użyciu programu BioRender.com.

8.5. Izolacja RNA i reakcja odwrotnej transkrypcji (RT-PCR)

Do analizy zmian w ekspresji genów w pierwszym etapie zostało wyizolowane mRNA. W tym celu komórki zostały odklejone przy użyciu akutazy (hodowla adherentna) lub odwirowane z pożywki (hodowla 3D). Następnie komórki przepłukano w roztworze PBS, odwirowano (4 minuty, 1200 rpm) i zawieszono w odczynniku Fenożol (A&A Biotechnology). Próbkę przechowywano w -20°C do dalszej analizy. Do właściwej izolacji mRNA został wykorzystany zestaw kolumn do izolacji: RNA MiniConcentrator Kit (A&A Biotechnology). Wszystkie

procedury zostały wykonane według protokołu producenta. Otrzymane stężenie mRNA mierzono za pomocą urządzenia Nanodrop ND-1000 (Thermo Fischer Scientific).

W celu uzyskania cDNA z badanych prób wykonano reakcję odwrotnej transkrypcji. Do reakcji wykorzystano zestaw High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems). Pobierano odpowiednią ilość roztworu RNA, w której znajdowało się 1000 ng w/w 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 a następnie schłodzenie do temperatury 4°C.

8.6. Ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (qPCR) – analiza ekspresji genów

Do przeprowadzenia ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy użyto odczynnika SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies). Sekwencje starterów użytych do reakcji przedstawiono w tabeli (*Tabela 4*). Reakcję przeprowadzono w termocyklerze 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems). Poziom ekspresji β -aktyny (*BACT*) zastosowano jako gen referencyjny. 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.

Tabela 4 Sekwencje starterów dla genów ludzkich użyte do analizy PCR w czasie rzeczywistym.

Gen	Sekwencja referencyjna NCBI	Wielkość produktu	Sekwencja starterów (5' -> 3')
Geny endotelialne			
<i>CD146</i>	NM_006500.3	117 pz	F: TCCAACGACCTGGGCAAAAA R: ATGAGGACTGGCAGTGGAAAGT
<i>VEGF-A</i>	NM_001025366.3	91 pz	F: ATGACGAGGGCCTGGAGTGTG R: CCTATGTGCTGGCCTTGGTGAG
<i>VEGFR2</i>	NM_002253.4	123 pz	F: CGGTCAACAAAGTCGGGAGA R: CAGTGCACCACAAAGACACG
<i>VEGF-C</i>	NM_005429.5	96 pz	F: GAGGAGCAGTTACGGTCTGTG R: TCCTTTCCTTAGCTGACACTTGT
<i>VEGFR3</i>	XM_054352180.1	120 pz	F: TGCACGAGGTACATGCCAAC R: GCTGCTCAAAGTCTCTCACGAA
Geny neuralne			
<i>Nestyna</i>	NM_006617.2	64 pz	F: GGGAAGAGGTGATGGAACCA R: AAGCCCTGAACCCTCTTTGC
<i>β-Tubulina III</i>	NM_001197181.2	126 pz	F: GGAAGAGGGCGAGATGTACG R: GGGTTTAGACACTGCTGGCT
<i>GFAP</i>	NM_001363846.2	100 pz	F: CCGACAGCAGGTCCATGT R: GTTGCTGGACGCCATTG
<i>NG2</i>	NM_001897.5	118 pz	F: GTCTACACCATCGAGCAGCC R: TGTGTGAGAACAGCACGAGC
<i>S100β</i>	NM_006272.3	91 pz	F: AGCGCTCCTGGAAAAAGCAA R: TTGAATCGCATGGGTCACGG
<i>Map2</i>	NM_001375545.1	99 pz	F: TTGGTGCCGAGTGAGAAGA R: GTCTGGCAGTGGTTGGTTAA
Geny referencyjne			
<i>β-ACTIN</i>	NM_001101.5	250 pz	F: CATGTACGTTGCTATCCAGGC R: CTCCTTAATGTCACGCACGAT
<i>RPLP0</i>	NM_053275.4	71 pz	F: AAAATCTCCAGGGGCACCATT R: GCTCCCACTTTGTCTCCAGT

8.7. Analiza sekretomów we współkulturach komórkowych

Analizę czynników wydzielanych do pożywki prowadzono z użyciem zestawu MagneticLuminex® Assay: Human Premixed Multi-Analyte Kit (R&D Systems, USA). Analizę prowadzono na czarnej płytce 96- dołkowej zgodnie z załączonym protokołem. Do wszystkich dołków nałożono po 50 μ l mieszaniny mikrokulek magnetycznych opłaszczonych przeciwciałami.

Następnie dodano po 50 μ l standardów lub badanych próbek. Inkubowano 2 godziny z wytrząsaniem (prędkość: 800 rpm) w RT. Po tym czasie dołki 3- krotnie przepłukano następnie dodano 50 μ l mieszaniny biotynylowanych przeciwciał i inkubowano 1 godzinę z wytrząsaniem w RT. Następnie dołki przepłukano buforem płuczącym i dodano 50 μ l roztworu streptawidyny-PE. Próby inkubowano 30 min i przepłukano buforem płuczącym. Do analizy mikrokulki zawieszono w 100 μ l buforu płuczącego poprzez wytrząsanie z prędkością 800 rpm przez 2 minuty. Odczytu dokonano z wykorzystaniem urządzenia Luminex Bio-Plex® 200 System (Bio- Rad). Analizowane analizy przedstawiono w tabeli (Tabela 5).

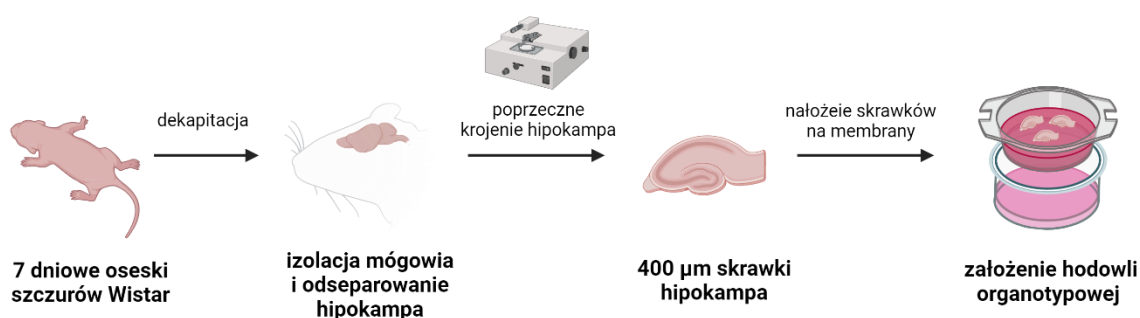
Tabela 5 Wykaz czynników rozpuszczalnych analizowanych z wykorzystaniem technologii Luminex.

	<i>Funkcja</i>		
	Czynnik wzrostu	Angiogeneza	Neuroprotekcja
<i>Analizy</i>	EGF bFGF	VEGF VEGF-C HGF	GDNF BDNF NGF

MODEL EX VIVO

1. Organotypowa hodowla skrawków hipokampa

W celu założenia hodowli organotypowej hipokampy zostały wyizolowane z 7- dniowych osesków szczurów stada Wistar. Zwierzęta usypiano poprzez wprowadzenie w stan głębokiej hipotermii, dekapitowano, a następnie izolowano mózgowie. Po pozyskaniu hipokampów krojono je poprzecznie na ok. 400 μ m skrawki przy użyciu urządzenia McIlwain Tissue Chopper (Stoelting). Wyizolowane fragmenty hipokampa przepłukano buforem i przeniesiono na membrany półprzepuszczalne (Millicell CM, Millipore) po 3 skrawki na membranę i umieszczono w płytkach 6-dołkowych z pożywką DMEM z dodatkiem suplementu B27 i 1% AAS. Hodowlę organotypową utrzymywano w warunkach 5% CO₂, 35°C i 95% wilgotności (Rycina 9).



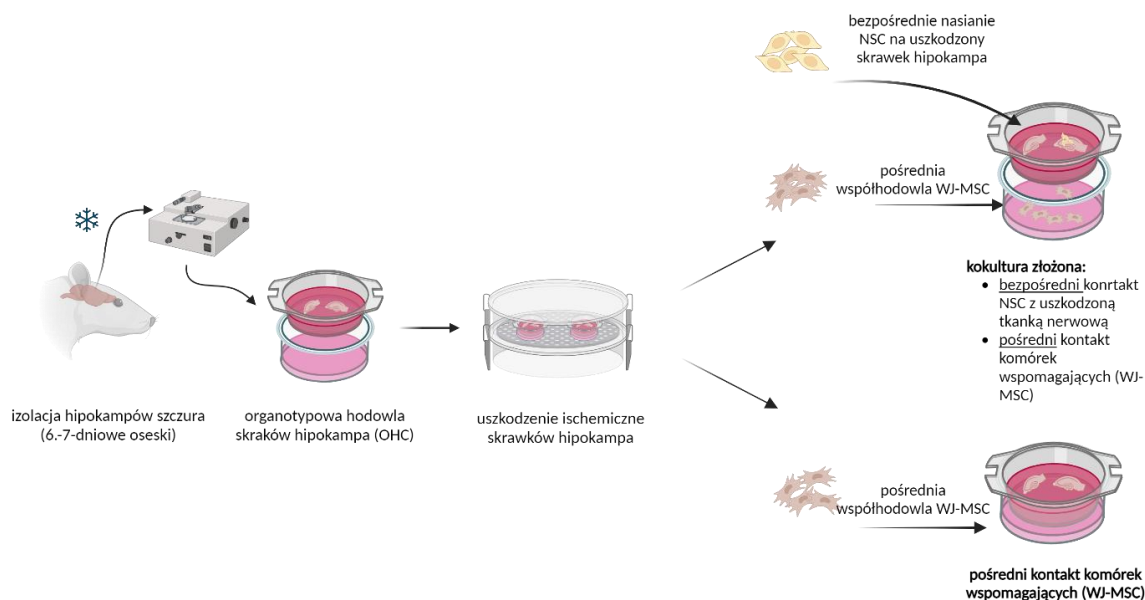
Rycina 9 Schemat zakładania hodowli organotypowej skrawków hipokampa. Rycina stworzona przy użyciu programu BioRender.com.

2. Model uszkodzenia ischemicznego skrawków hipokampa szczura (OGD)

W celu uzyskania modelu uszkodzenia niedokrwiennej tkanki *ex vivo* wykonano procedurę OGD. Skrawki hipokampa przepłukano buforem PBS. Następnie półprzepuszczalne membrany ze skrawkami hipokampa przeniesiono do 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 hipoksyjnej, a następnie utrzymywano je w atmosferze wolnej od tlenu (95% N₂; 5% CO₂) przez 40 minut. Skrawki kontrolne były utrzymywane w standardowych warunkach (5% O₂, 5% CO₂, 35°C).

3. Współhodowla organotypowych skrawków hipokampa z WJ-MSC i NSC/NPC

W celu określenia zmian w wydzielaniu WJ-MSC w obecności ischemicznie uszkodzonej tkanki nerwowej oraz w obecności egzogennych NSC/NPC nasiewanych na tkankę wykonano organotypową współhodowlę ze skrawkami hipokampa poddanymi OGD Rycina 10.



Rycina 10 Schemat zakładania współhodowli WJ-MSC oraz NSC/NPC z organotypową hodowlą skrawków hipokampa szczura. Rycina stworzona przy użyciu programu BioRender.com.

3.1. Analiza właściwości neuroprotekcyjnych komórek WJ-MSC i NSC/NPC

Do oceny przeżycia komórek w regionie CA1 hipokampa zastosowano przeżyciowe barwienie jodkiem propidyny, który przenika tylko przez uszkodzone błony komórkowe. Do nieutrwalonych skrawków organotypowych dodawano jodku propidyny w stężeniu 5 $\mu\text{g/ml}$, a następnie inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze 35°C. Następnie zmieniano pożywkę na świeżą i obserwowano przeżyciowo liczbę martwych komórek wyznakowanych jodkiem propidyny w regionie CA1 hipokampa. Zdjęcia wykonywano przy pomocy mikroskopu LSM 780 oprogramowania Zen 2012 (Zeiss). Zastosowano następujące warianty doświadczalne:

- organotypowe skrawki hipokampa (kontrola);
- organotypowe skrawki hipokampa po OGD (uszkodzenie);
- organotypowe skrawki hipokampa po OGD i współhodowli z WJ-MSC;
- organotypowe skrawki hipokampa po OGD i nasianymi na skrawek NSC.
- organotypowe skrawki hipokampa po OGD i współhodowli z WJ-MSC oraz nasianymi na skrawek NSC.

3.2. Analiza sekretomu WJ-MSC i NSC/NPC

Po 3 dniach współhodowli WJ-MSC ze skrawkami organotypowymi poddanymi OGD i nasianymi na nie egzogennymi NSC/NPC zebrano pożywkę hodowlaną, zamrożono i przechowywano w -80°C do czasu analizy. Analizę czynników przeprowadzono metodą Luminex zgodnie z protokołem opisanym w rozdziale: *Materiał i metody, Modele in vitro, punkt 8.7.*

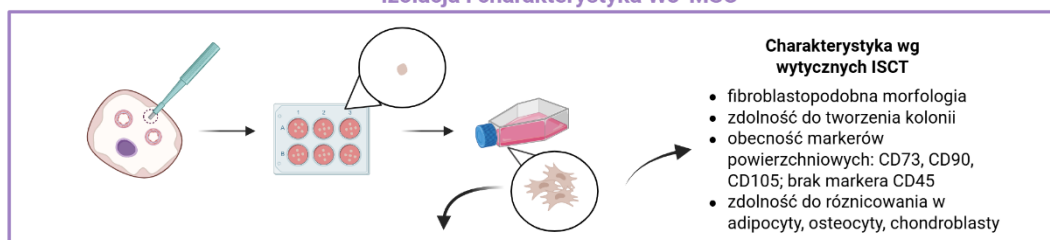
ANALIZA STATYSTYCZNA

Wyniki zostały przedstawione jako średnia $\pm$ odchylenie standardowe, uzyskane na podstawie 3 niezależnych izolacji WJ-MSC, przy co najmniej trzech powtórzeniach w ramach jednego eksperymentu. Analiza statystyczna została przeprowadzona w programie GraphPad Prism 10 z zastosowaniem testu t-Studenta (dla porównania dwóch grup) lub jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA oraz testu wielokrotnych porównań Tukeya (wiele grup). W przypadku porównania dwóch czynników zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA. Za istotne statystycznie uznano wyniki, dla których $p < 0,05$. Poziomy istotności statystycznej oznaczono w następujący sposób: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

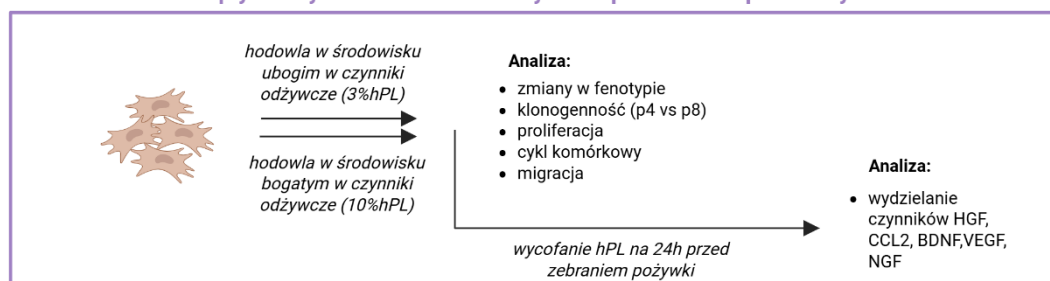
Graficzny schemat doświadczeń

Ocena interakcji z poszczególnymi komponentami niszy

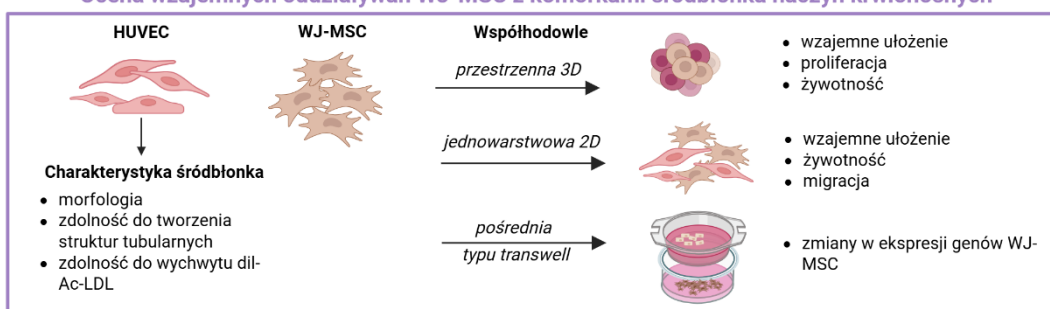
Izolacja i charakterystyka WJ-MSC



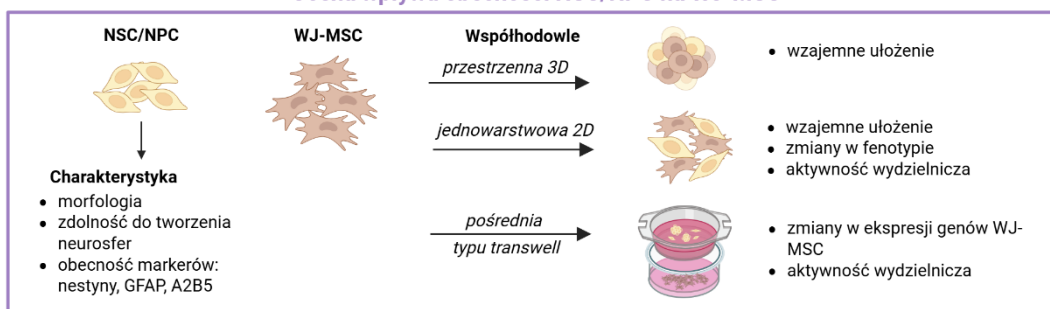
Ocena wpływu czynników środowiskowych na podstawowe parametry WJ-MSC



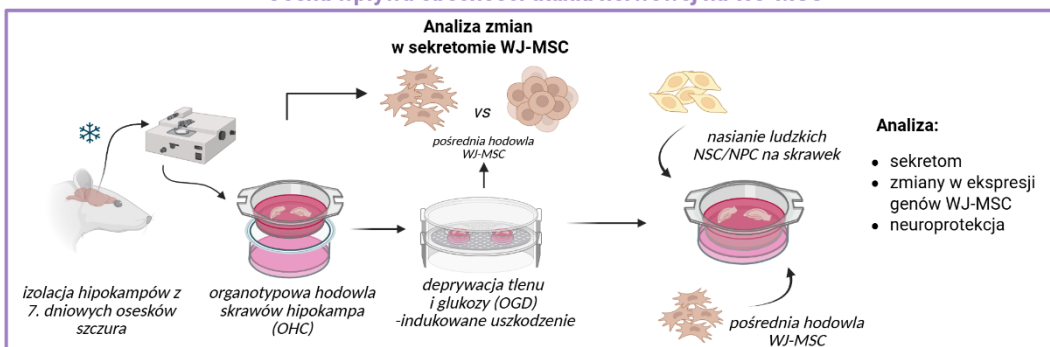
Ocena wzajemnych oddziaływań WJ-MSC z komórkami śródbłonia naczyń krwionośnych



Ocena wpływu obecności NSC/NPC na WJ-MSC



Ocena wpływu obecności tkanki nerwowej na WJ-MSC



Wyniki

1. Analiza fenotypu WJ-MSC

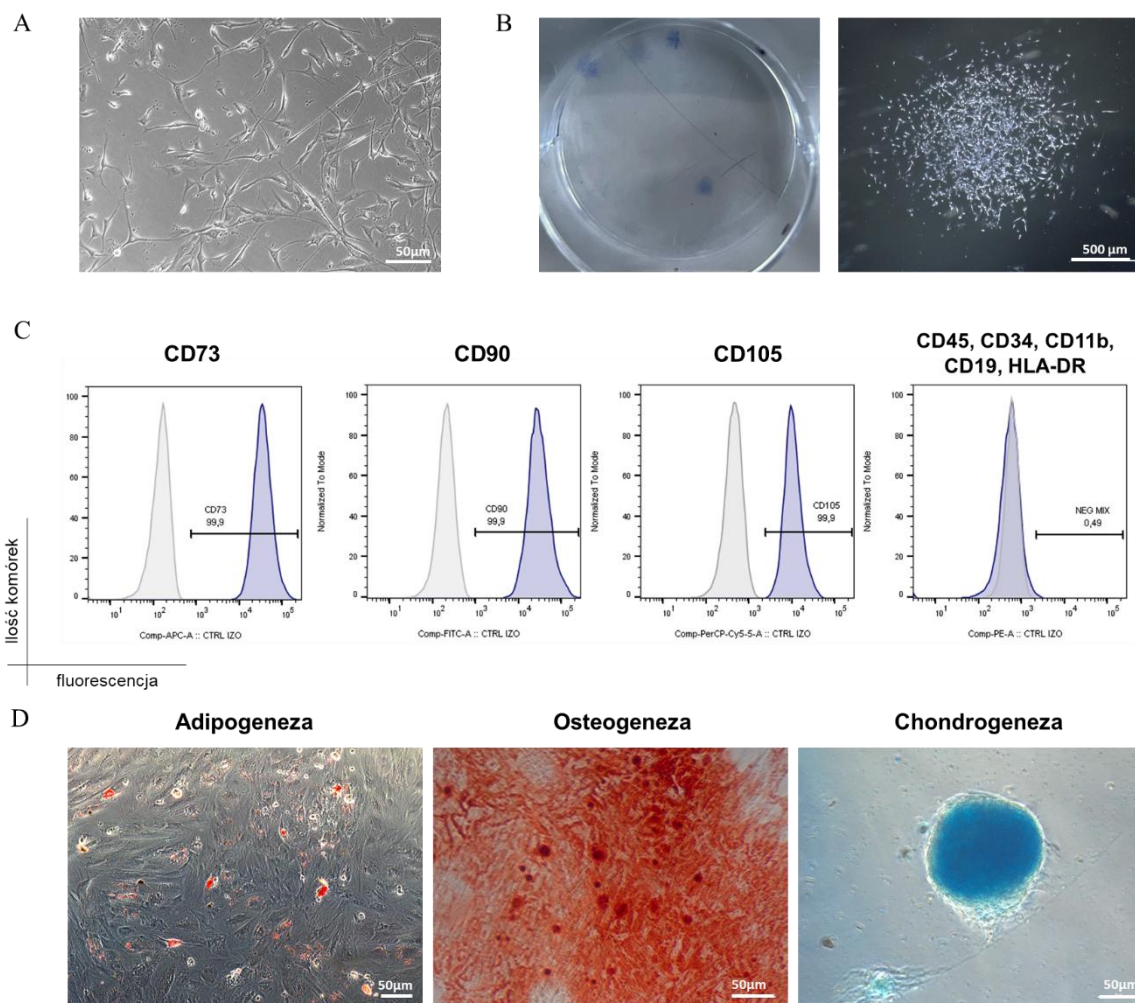
Komórki pozyskane z galarety Whartona zostały scharakteryzowane zgodnie z wytycznymi ISCT [45], które określają minimalne i niezbędne kryteria dla MSC. Kryteria te obejmują: fibroblastopodobny kształt, zdolność do przyczepiania się do powierzchni plastikowego naczynia hodowlanego, ekspresję markerów powierzchniowych CD73, CD90, CD105 (powyżej 95% populacji) oraz brak ekspresji markerów hematopoetycznych ($< 1\%$ w populacji). Dodatkowo, aby zdefiniować mezenchymalne komórki jako macierzyste, muszą posiadać zdolność do różnicowania się w inne typy komórek pochodzących z mezodermalnego listka zarodkowego, takie jak adipocyty, osteocyty i chondrocyty i wykazywać potencjał klonogeny.

Komórki wyizolowane z galarety Whartona wymigrowały z pozyskanych fragmentów zrębu pępowiny adherując do podłoża naczynia hodowlanego. Przyjmowały po adhezji wrzecionowaty kształt przypominający fibroblasty (*Rycina 11A*). Posiadały również zdolność do tworzenia pojedynczych kolonii, co potwierdza ich potencjał klonogeny (*Rycina 11B*). W analizie cytometrycznej 99,9% komórek wykazywała na swojej powierzchni markery CD73, CD90, CD105 przy jednoczesnym braku ekspresji markerów hematopoetycznych: CD45, CD34, CD11b, CD19, HLA-DR ($\sim 0,49\%$) (*Rycina 11C*).

W celu wykazania zdolności do różnicowania WJ-MSC w inne typy komórek mezodermalnych, komórki hodowano w pożywkach indukujących odpowiednio adipogenezę, osteogenezę oraz chondrogenezę. W pożywce indukującej adipogenezę zaobserwowano zmianę morfologii komórek na owalną oraz obecność kropli tłuszczu, potwierdzoną barwieniem czerwienią oleistą. W pożywce osteogennej, po wybarwieniu komórek czerwienią alizarynową stwierdzono odkładanie się złogów soli wapnia wokół komórek i między nimi, natomiast w pożywce chondrogennej, po wybarwieniu komórek błękitem alcjanowym uwidoczono obecność glikozaminoglikanów (*Rycina 11D*).

Uzyskane wyniki potwierdziły zdolność WJ-MSC do różnicowania w inne typy komórek mezodermalnego listka zarodkowego (adipocyty, osteocyty oraz chondrocyty).

Wyniki te potwierdzają spełnienie przez WJ-MSC wszystkich kryteriów dla mezenchymalnych komórek macierzystych/stromalnych określonych przez Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowych i Genowych.



Rycina 11 Charakterystyka komórek mezenchymalnych. Fibroblastopodobna morfologia wyizolowanych WJ-MSC (A). Klonogenność- zdolność do tworzenia kolonii. Makroskopowa wizualizacja kolonii wybarwionych błękitem toluidyny oraz morfologia pojedynczej kolonii w powiększeniu 25x (B) Analiza markerów CD73, CD90, CD105 oraz CD45,CD34, CD11b,CD19,HLA-DR metodą cytometrii przepływowej (C). Wynik barwienia po różnicowaniu komórek w kierunku adipocytów, osteocytów oraz chondrocytów (D).

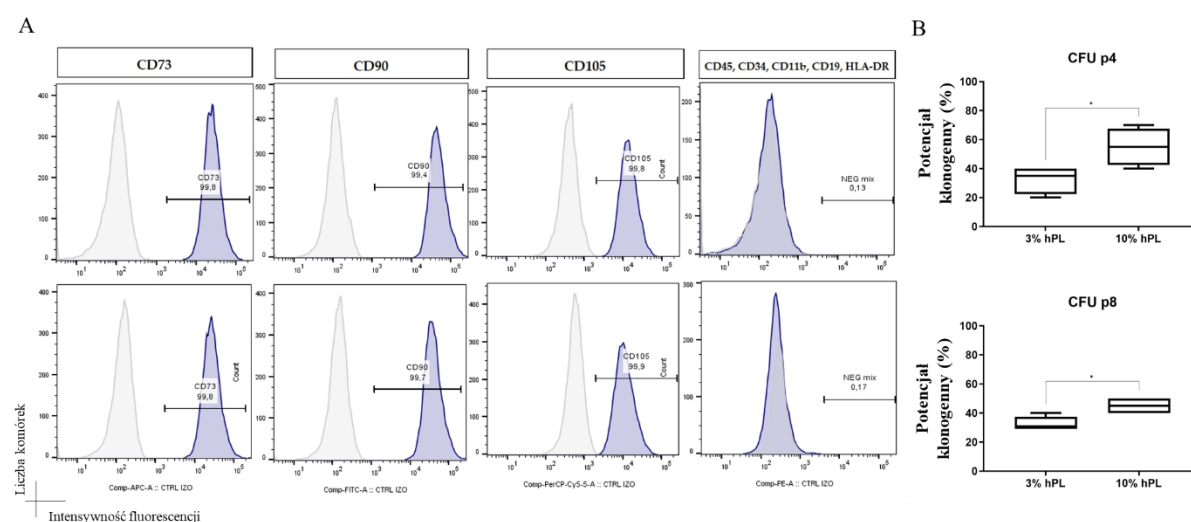
2. Modulacja właściwości biologicznych WJ-MSC przez różne stężenia czynników odżywczych (lizatu płytkowego)

Komórki wspierające w niszy komórkowej, w tym neuralnej, pełnią istotną rolę w regulacji aktywności komórek macierzystych/ progenitorowych, reagując na zmieniające się warunki mikrośrodowiska, w tym na dostępność czynników troficznych. W przedstawionym modelu eksperymentalnym funkcję stromalnego komponentu przypisano WJ-MSC, natomiast źródłem czynników troficznych zastosowanych w hodowli był ludzki lizat płytkowy (hPL). Postawione pytanie badawcze dotyczyło zagadnienia, które z warunków troficznych środowiska będzie silniej

aktywować właściwości spierające WJ-MSC: warunki ubogie w substancje odżywcze, odzwierciedlające środowiskową deprywację, czy może środowisko bogate w czynniki troficzne. Aby odpowiedzieć na to pytanie, przeprowadzono analizę porównawczą parametrów biologicznych komórek hodowanych w obecności niskiego (3%) oraz wysokiego (10%) stężenia hPL. Ocenie poddano zarówno podstawowe parametry hodowli obejmujące: charakterystykę fenotypową, klonogenność, proliferację i migrację, jak i profil wydzielniczy WJ-MSC, koncentrując się na czynnikach troficznych istotnych dla pełnienia funkcji wspierającej w niszy neuralnej.

2.1. Wpływ stężenia hPL na podstawowe parametry hodowli WJ-MSC

Stężenie czynników troficznych w środowisku (3% vs 10% hPL) nie wpłynęło na ekspresję charakterystycznych dla WJ-MSC markerów t.j. CD73, CD90 i CD105 (*Rycina 12 A*). Zmienił się natomiast potencjał klonogeniczny tych komórek. Różnice były zależne zarówno od stężenia lizatu, jak i czasu ekspozycji (dostępu do czynników troficznych). WJ-MSC wykazywały wyższy potencjał klonogeniczny w hodowli z 10% hPL vs z 3% hPL, bez względu na liczbę pasażu (p4: 55% $\pm$ 12 vs 38,3% $\pm$ 8; p8: 46% $\pm$ 5,4 vs 32% $\pm$ 5) W hodowli z 10% hPL potencjał klonogeniczny w pasażu wczesnym (4) był wyższy w porównaniu z pasażem późnym (8). W kolejnych pasażach zdolność klonogenna komórek hodowanych w 10% hPL ulegała stopniowemu obniżeniu (o ok. 10%), podczas gdy w warunkach 3% hPL pozostawała na zbliżonym poziomie (*Rycina 12 B*).



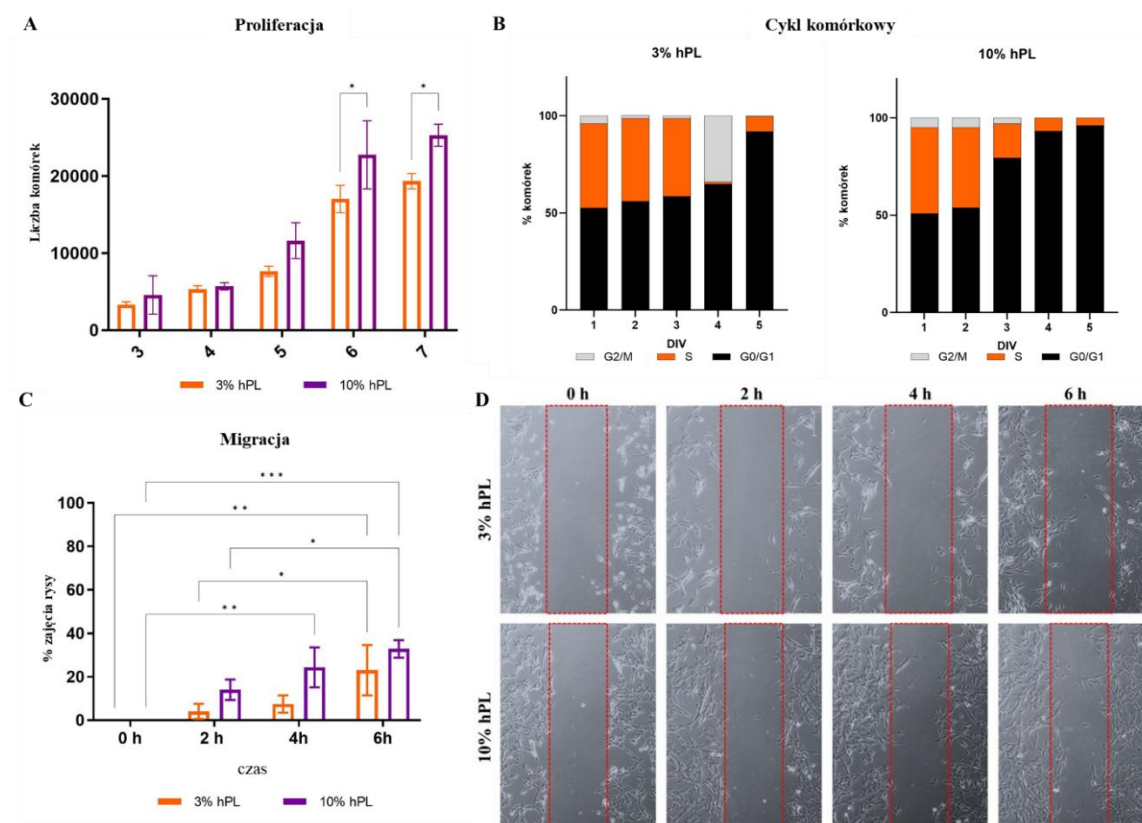
Rycina 12 Charakterystyka markerów powierzchniowych MSC w hodowli WJ-MSC zawierającej 3% hPL oraz 10% hPL (A). B- Porównanie potencjału klonogennego WJ-MSC hodowanych w pożywce z 3% hPL oraz 10% hPL we wczesnym pasażu (p4) oraz późnym pasażu (p8). Statystyka: test t-studenta, n = 3, *p < 0.05 (B).

2.2. Ocena proliferacji i migracji WJ-MSC w środowisku o niskiej i wysokiej zawartości czynników odżywczych.

Dostęp do czynników odżywczych wpływał na proliferację WJ-MSC (Rycina 13 A). Bez względu na badany skład środowiska (3% vs 10% hPL), WJ-MSC do 3. dnia hodowli *in vitro* (DIV - (*ang.* day *in vitro*)) osiągnęły zbliżoną konfluencję oraz wykazywały podobne tempo proliferacji i przebieg cyklu komórkowego. W 4 DIV tempo proliferacji wzrosło w warunkach wysokiego stężenia hPL, osiągając 85% konfluencji, podczas gdy w 3% hPL hodowla osiągnęła konfluencję wynoszącą około 70%. W celu potwierdzenia obserwacji proliferacyjnych przeprowadzono analizę cyklu komórkowego (Rycina 13 B).

WJ-MSC hodowane w 10% hPL po 3 dniach hodowli *in vitro* wykazywały wysoki odsetek komórek w fazach podziałowych cyklu (G2/M: 17,7%; S: 2,94%). W 4 DIV doszło do zahamowania cyklu komórkowego (G2/M: 0%; S: 6,8%; G0/G1: 93,2%) najprawdopodobniej w wyniku kontaktowego zahamowania wzrostu, co było zgodne z obserwowaną konfluencją. Natomiast komórki hodowane w 3% hPL w 4 DIV wciąż charakteryzowały się wysokim odsetkiem komórek aktywnie dzielących się (G2/M: 64,94%; S: 1%), a dopiero w 5 DIV osiągały stan zahamowania cyklu (G2/M: 0,29%; S: 7,71%; G0/G1: 92%). Uzyskane wyniki potwierdzają, że dynamika proliferacji WJ-MSC jest ściśle zależna od dostępu komórek do czynników odżywczych i troficznych w środowisku.

W celu oceny migracji komórek zastosowano test rysy (*ang.* *scratch assay*) (Rycina 13 C-D). W warunkach niskiego stężenia hPL (3%), w początkowych punktach czasowych (2 i 4 godziny) komórki WJ-MSC wykazywały minimalną zdolność migracyjną. Zastosowanie wyższego stężenia hPL (10%) istotnie nasilało migrację WJ-MSC, a efekt ten był zauważalny już po 2 godzinach od rozpoczęcia eksperymentu (po 2 h: 14,1% $\pm$ 3,8 vs. 4,1% $\pm$ 2,8). Podobną zależność odnotowano w kolejnych punktach czasowych – komórki hodowane w wysokim stężeniu hPL szybciej kolonizowały obszar zarysowania niż komórki hodowane w niskim stężeniu hPL (po 4 h: 24,4% $\pm$ 7,5 vs. 7,5% $\pm$ 3,3; po 6 h: 32,8% $\pm$ 3,3 vs. 23,1% $\pm$ 9,4 odpowiednio dla wyższego i niższego stężenia hPL).



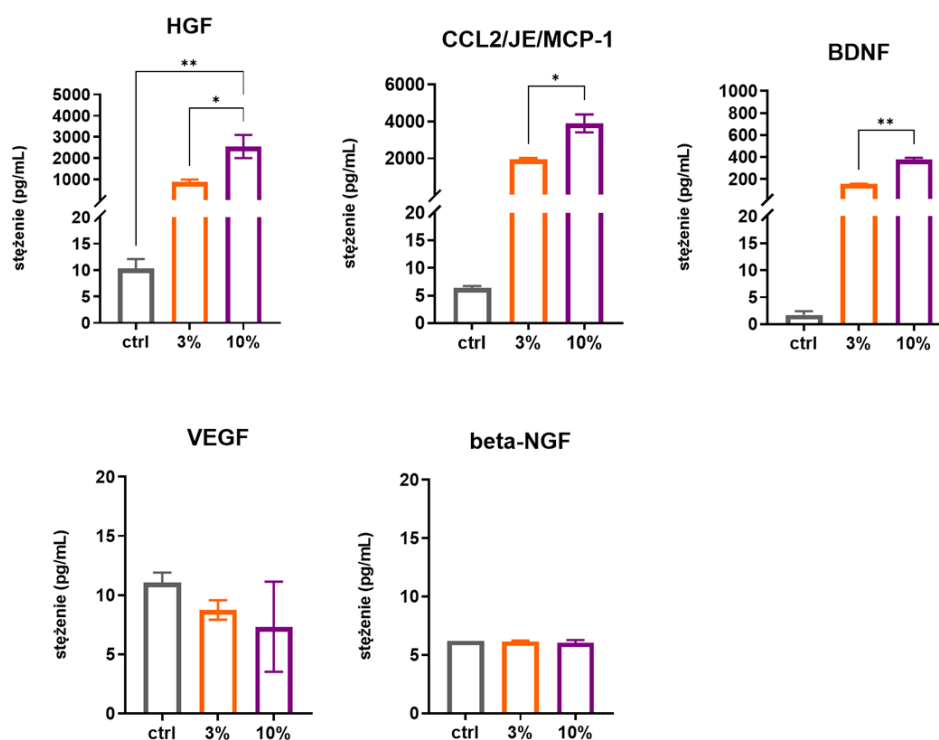
Rycina 13 Porównanie proliferacji WJ-MSC w hodowli 7-dniowej dla pożywki z 3% hPL oraz 10% hPL (A). Zmiany w poszczególnych fazach cyklu komórkowego w ciągu pięciu dni hodowli in vitro (B). Ocena zmian w migracji WJ-MSC w pożywce z 3% hPL oraz 10% hPL. Ocena ilościowa (C) oraz wybrana wizualizacja migracji (D). n = 3, *p < 0.05, ** < 0.01, ***p < 0.001.

2.3. Analiza sekretomu WJ-MSC w środowisku o różnej zawartości czynników odżywczych.

Zdolność do proliferacji i migracji stanowi ważny element funkcjonalności WJ-MSC, jednak kluczowe znaczenie w kontekście wspierania niszy komórkowej mają ich właściwości wydzielnicze. To one decydują o modulacji mikrośrodowiska, regulacji odpowiedzi zapalnej, neuro- i angioprotekcji. Z tego względu, w kolejnym etapie doświadczeń przeprowadzono analizę sekretomu WJ-MSC w środowisku o różnej zawartości czynników odżywczych. Oceniono zmiany w wydzielaniu podstawowych białek parakrynnych t.j.: czynnik immunomodulujący CCL-2, czynniki wzrostu: HGF i VEGF oraz czynniki neurotroficzne: BDNF i beta-NGF. W celu wyeliminowania ryzyka oznaczania czynników pochodzących bezpośrednio z hPL, lizat został usunięty z pożywki hodowlanej na 24 godziny przed jej zebraniem, tak aby analizie podlegały wyłącznie czynniki wydzielane przez WJ-MSC. Jako kontrolę zastosowano czysty DMEM inkubowany w czasie równoważnym do prowadzonej hodowli.

Poziomy wydzielanych czynników różniły się w zależności od stężenia hPL w środowisku. Analiza wykazała istotnie wyższe stężenia czynników t.j. HGF, BDNF i CCL-2 w hodowli

przewodzonej w warunkach większego dostępu do składników odżywczych (10% hPL). Stosowane stężenie hPL nie miały wpływu na wydzielanie przez komórki takich czynników jak VEGF i beta-NGF. Nie stwierdzono istotnych różnic w wydzielaniu VEGF i β -NGF pomiędzy hodowlami prowadzonymi w różnych stężeniach hPL, a pożywką kontrolną (Rycina 14).



Rycina 14 Analiza czynników wydzielniczych komórek hodowanych w pożywce z 3% oraz 10% hPL. Lizat płytkowy został wycofany na 24h przed zebraniem pożywki do analizy. Statystyka: jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA, $n=3$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Podsumowanie

W naszym modelu lizat płytkowy stanowił źródło czynników troficznych obecnych również w niszy neuralnej i regulujących aktywność jej stromalnego komponentu.

Analiza wykazała, że dostęp do tych czynników nie wpływał na fenotyp i podstawowe parametry WJ-MSC, w tym morfologię ani ekspresję markerów mezenchymalnych, natomiast istotnie modulował parametry związane z żywotnością i aktywnością biologiczną komórek. Efekt ten był dawkozależny. W warunkach wyższego stężenia hPL (10%) komórki charakteryzowały się wyższym potencjałem proliferacyjnym i migracyjnym oraz zwiększały wydzielanie czynników troficznych, takich jak HGF i BDNF. Wyniki te sugerują, że bogatsze mikrośrodowisko sprzyja nasileniu funkcji parakrynnych WJ-MSC, co wskazuje na istotną rolę dostępności czynników troficznych w regulacji aktywności stromalnego komponentu niszy neuronalnej.

3. Udział WJ-MSC w odbudowie komponentu naczyniowego niszy komórkowej - analiza interakcji WJ-MSC z komórkami śródbłónka naczyń krwionośnych

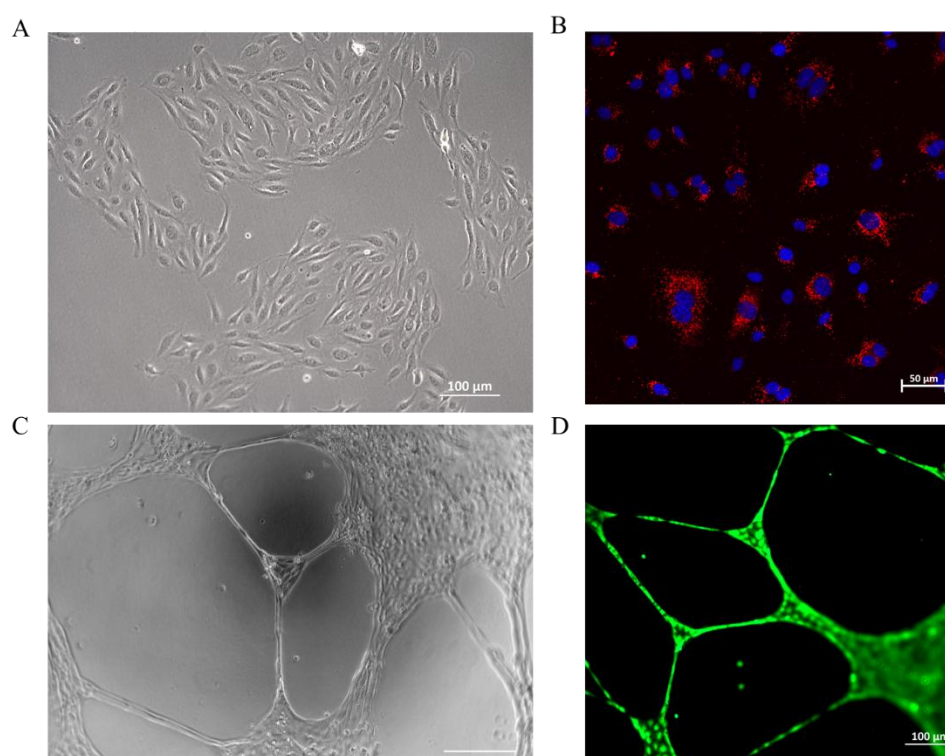
W badaniach nad interakcjami komórek śródbłónka (HUVEC) z komponentem wspierającym niszy komórkowej kluczowe znaczenie ma dobór materiału komórkowego pochodzenia ludzkiego, aby uniknąć różnic międzygatunkowych i z tym związanych różnic w aktywowanych ścieżkach sygnałowych. WJ-MSC, jako ludzkie komórki stromalne mogą stanowić potencjalny model do analizy takich interakcji, zastępując w tym zakresie modele zwierzęce. A aktywność parakrynną WJ-MSC modulująca angiogenezę, dodatkowo uzasadnia ich wykorzystanie w analizie mechanizmów wspierających odbudowę komponentu naczyniowego w niszy neuralnej co zostało obszerniej opisane we wstępie.

Poniżej przedstawiono wyniki ukazujące potencjalną rolę WJ-MSC we wsparciu środowiska naczyń krwionośnych. Analizie poddano interakcje WJ-MSC z komórkami śródbłónka (HUVEC), obejmujące:

- bezpośrednie oddziaływania przestrzenne (wpływ na żywotność, proliferację i migrację obu populacji),
- pośrednie oddziaływania oceniane w systemie transwell dotyczące wpływu czynników rozpuszczalnych wydzielanych przez układ WJ-MSC vs HUVEC na zmiany w ekspresji genów WJ-MSC (aspekt angiogeny).

3.1. Analiza fenotypu komórek śródbłónka (HUVEC)

Komórki śródbłónka naczyń krwionośnych wyizolowane z żyły ludzkiej pępowiny (HUVEC) posiadały w hodowli in vitro charakterystyczny dla sześciennych, lekko wydłużonych fenotyp. Hodowla miała tendencję do wzrostu w koloniach (*Rycina 15 A*). Analiza deacetylowanych lipoprotein niskiej gęstości wykazała zdolność HUVEC do ich wychwytu (*Rycina 15 B*). Dodatkowo komórki po wysianiu na podłoże pokryte mieszaniną macierzy zewnątrzkomórkowej (matrigel) tworzyły charakterystyczne struktury naczyńopodobne (tubularne) zachowując wysoką żywotność do 72 h (*Rycina 15 C-D*). Wszystkie te cechy potwierdziły aktywny fenotyp śródbłónka i były kontrolą pozytywną do różnicowania WJ-MSC w kierunku śródbłónka.



Rycina 15 Analiza fenotypu HUVEC: morfologia (A), zdolność do wychwytu deacetylowanych lipoprotein niskiej gęstości (czerwona fluorescencja) (B), zdolność do tworzenia struktur naczyniowych (C), żywotność komórek w powstałych strukturach- barwienie kalceiną- zielona fluorescencja (D).

3.2. Charakterystyka relacji przestrzennych we współhodowlach WJ- MSC+HUVEC

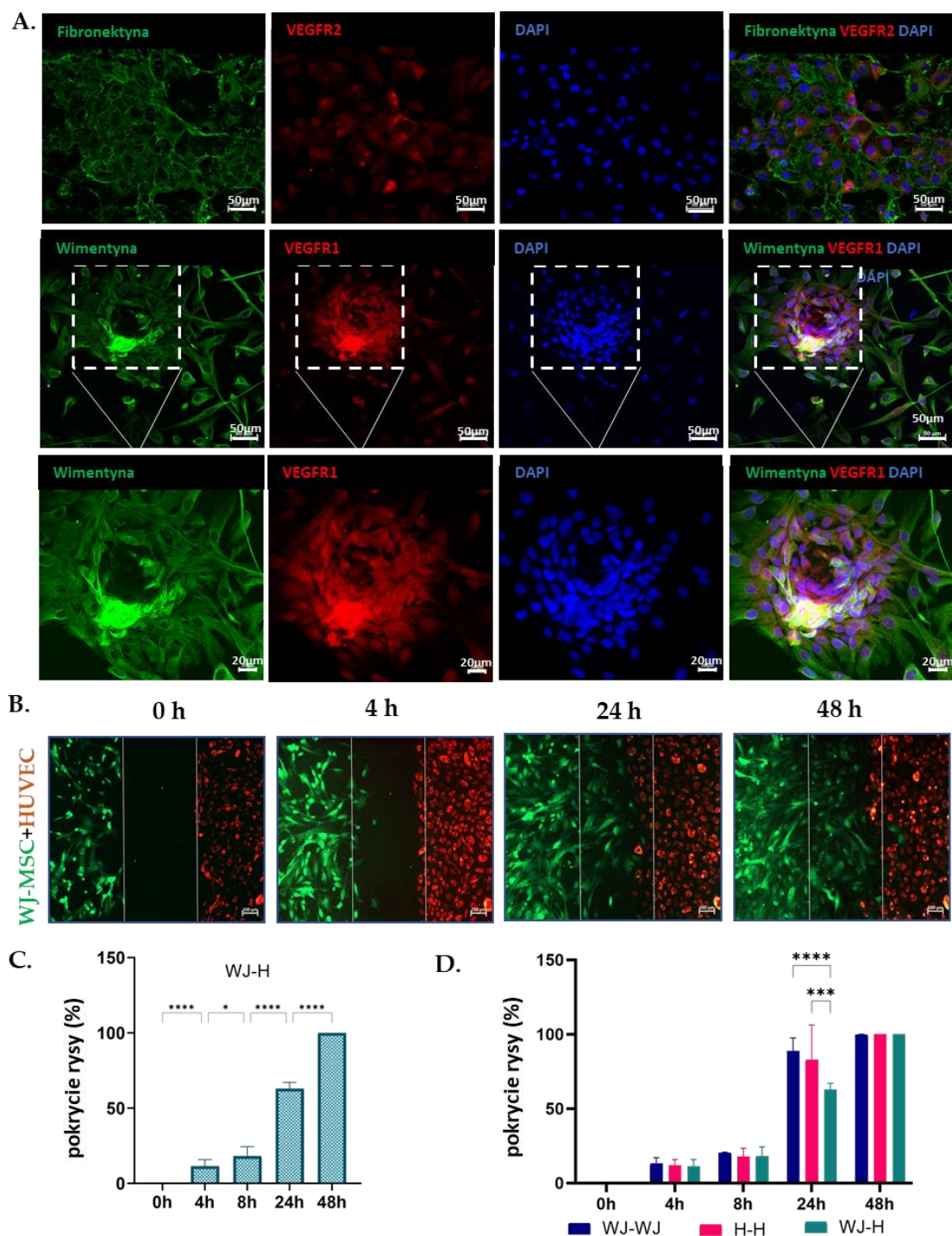
WJ-MSC modelujące wspierający (stromalny) komponent niszy komórkowej, mogą oddziaływać z otoczeniem na dwa zasadnicze sposoby: poprzez mechanizmy parakryne, związane z wydzielaniem cząsteczek sygnałowych, oraz poprzez bezpośrednie interakcje komórka–komórka, obejmujące kontakty bezpośrednie i sygnały przekazywane drogą połączeń międzykomórkowych. Oba typy oddziaływań odgrywają istotną rolę w regulacji funkcji jednostki neuronaczyniowej. Z tego powodu w kolejnym etapie pracy poddano analizie właściwości relacji

WJ-MSC i HUVEC w warunkach hodowli 2D i trójwymiarowych (3D). Obserwacje te pozwoliły określić, w jaki sposób obie populacje organizują się przestrzennie, wzajemnie na siebie oddziałują i czy wykazują tendencję do tworzenia wspólnych struktur.

WJ-MSC oraz HUVEC w bezpośredniej współhodowli 2D utrzymały swoje typowe cechy morfologiczne – HUVEC tworzyły skupiska, natomiast WJ-MSC układały się wokół nich. W celu oceny wzajemnej organizacji WJ-MSC i HUVEC w warunkach 2D przeprowadzono barwienie immunofluorescencyjne. We współhodowli bezpośredniej, po osiągnięciu wysokiej konfluencji, obie populacje spontanicznie układały się w struktury o budowie pierścieniowej, przypominające prekursorzy tworzonych *in vivo* mikrostruktur naczyń. Struktury te miały regularny, okrągły kształt z pustym centrum, natomiast komórki zlokalizowane w ich wewnętrznej warstwie wykazywały ekspresję VEGFR1 na powierzchni błony komórkowej (*Rycina 16 A*). HUVEC wykazujące ekspresję VEGFR2 były zlokalizowane pomiędzy komórkami WJ-MSC, identyfikowanymi na podstawie obecności fibronektyny. Taka organizacja przestrzenna wskazuje, że WJ-MSC mogą pełnić rolę ochronną i wspierającą dla komórek śródbłonna, sprzyjając ich przeżywalności oraz stabilizacji. Dodatkowo zaobserwowano również zmniejszoną konfluencję komórek w obszarze otaczającym struktury pierścieniowe, co może wskazywać na aktywną migrację komórek w kierunku miejsca formowania się agregatu.

W celu określenia zdolności migracyjnych oraz potencjalnego wpływu jednej populacji komórek na dynamikę migracji drugiej, przeprowadzono test rysy. Dla lepszej wizualizacji komórki zostały wybarwione przyżyciowo: HUVEC na czerwono, a WJ-MSC na zielono. Po 4 godzinach obie populacje migrowały w głąb obszaru rysy. WJ-MSC wykazały silniejszy potencjał migracyjny i stanowiły dominującą populację komórek zajmującą wolną przestrzeń w obrębie rysy. Pokryły one cały obszar rysy w ciągu 24 godzin, podczas gdy w tym czasie w obrębie rysy znalazły się tylko pojedyncze HUVEC migrujące w kierunku WJ-MSC. Po zajęciu całej wolnej powierzchni WJ-MSC zaczęły wmigrowywać pomiędzy HUVEC (*Rycina 16 B*).

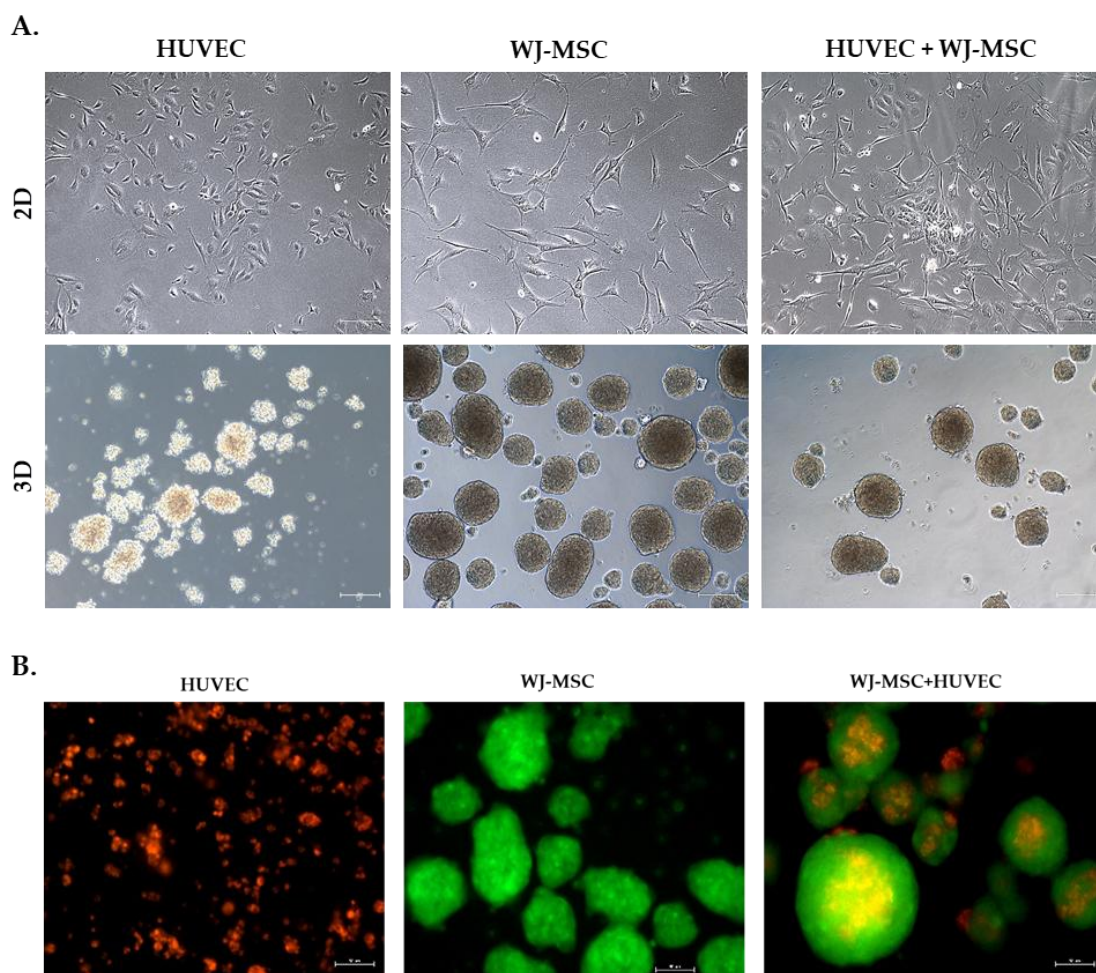
Dodatkowo przeprowadzono analizę tempa migracji WJ-MSC vs HUVEC do układów monokulturowych: WJ-MSC po obu stronach rysy, HUVEC po obu stronach rysy w czasie. Wszystkie grupy wykazywały podobne tempo migracji do ósmej godziny obserwacji. Po 24 godzinach pokrycie wynosiło średnio $88,9 \pm 8,7\%$ dla grupy WJ-MSC vs WJ-MSC oraz $83,04 \pm 23,3\%$ dla HUVEC vs HUVEC. Grupa WJ-MSC vs HUVEC wykazała istotnie niższe pokrycie zarysowania po tym czasie ($62,97 \pm 4,1\%$). Po 48 godzinach komórki we wszystkich grupach osiągnęły pełną konfluencję w obszarze zarysowania (*Rycina 16 C-D*).



Rycina 16 Kolokalizacja WJ-MSC i HUVEC we współhodowli na powierzchni adhezyjnej. Wizualizacja białek fibronektyny, VEGFR2, wimentyny oraz VEGFR1. Jądra komórkowe wybarwione DAPI (A). Analiza wzajemnej migracji WJ-MSC vs HUVEC w ciągu 48 h (B). Analiza ilościowa pokrycia rysy przez obie populacje (C). Porównanie migracji WJ-MSC vs HUVEC do migracji WJ-MSC vs WJ-MSC (WJ-WJ) oraz HUVEC vs HUVEC (H-H) (D). Statystyka: jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA, $n=3$, $*p < 0.05$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$.

Ponieważ nisza komórkowa jest strukturą trójwymiarową, a jej organizacja przestrzenna odgrywa znaczącą rolę, w kolejnym etapie porównano zachowania badanych populacji w wymuszonej współhodowli trójwymiarowej (3D), a następnie porównano do wyników uzyskanych z hodowli dwuwymiarowej (2D). W warunkach nieadhezyjnych komórki HUVEC

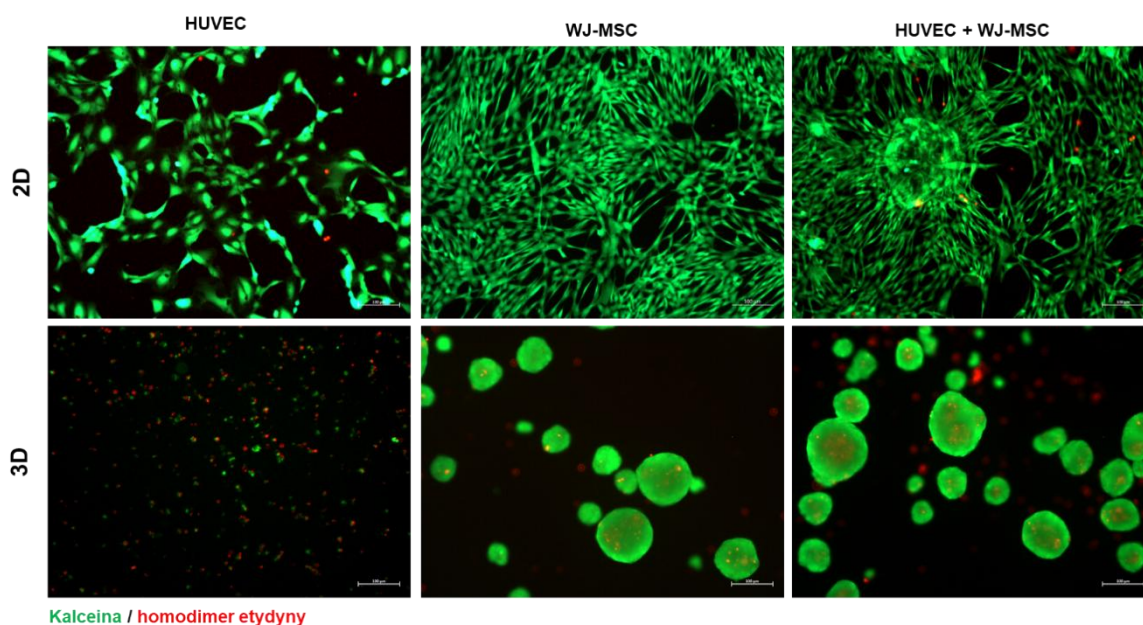
tworzyły nieregularne agregaty, natomiast WJ-MSC organizowały się w uporządkowane sfery. Co istotne, współhodowla obu typów komórek w systemie 3D prowadziła do powstania sfer mieszanych, w których HUVEC znajdowały się wewnątrz struktury, a WJ-MSC otaczały je na zewnątrz. Obserwacja ta została potwierdzona barwieniem fluorescencyjnym: WJ-MSC wyznakowano zielonym barwnikiem CMFDA, a HUVEC – pomarańczowym odpowiednikiem CMMRT, po czym przeprowadzono współhodowlę w opisanych warunkach (Rycina 17).



Rycina 17 Analiza morfologii HUVEC, WJ-MSC oraz współhodowli HUVEC+WJ-MSC na powierzchni adhezyjnej (2D) oraz nieadherentnej (3D) (A). Wzajemne ułożenie populacji HUVEC (czerwony) oraz WJ-MSC (zielony) w hodowli nieadherentnej (B)

W celu określenia żywotności, po 5 DIV współhodowli komórki poddano barwieniu kalceiną (komórki żywe) oraz homodimerem etydyny (komórki martwe). W hodowli 2D, zarówno HUVEC, jak i WJ-MSC komórki charakteryzowały się wysoką żywotnością – nie zaobserwono komórek martwych. Współhodowla WJ-MSC+HUVEC w warunkach 2D nie skutkowała zmniejszoną żywotnością komórek. W wymuszonej hodowli pojedynczej 3D, HUVEC obumierały, a w WJ-MSC zaobserwowano jedynie pojedyncze martwe komórki, które lokalizowały się wewnątrz sfer. Podobną obserwację odnotowano w przypadku współhodowli 3D. Charakter komórek śródbłonna wymusza na nich adhezję, dlatego też brak białek adhezyjnych na powierzchni płytki wywiera na

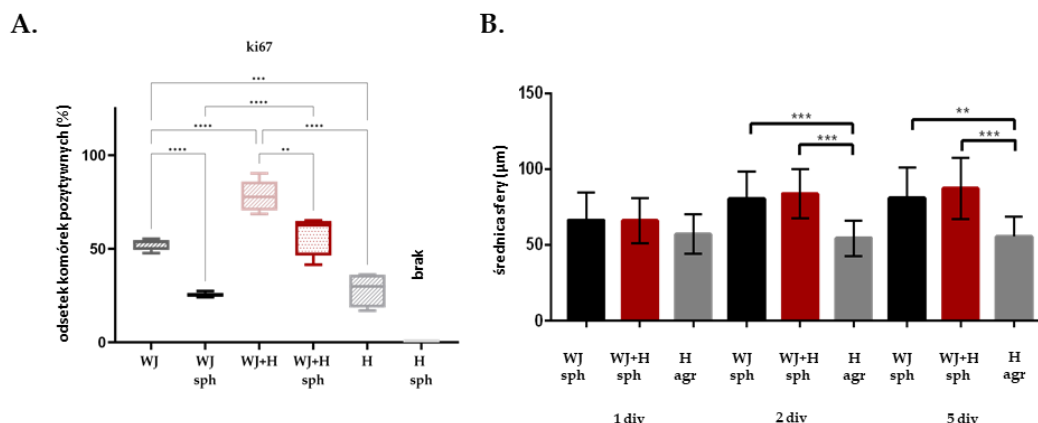
nie negatywny skutek, natomiast dzięki obecności WJ-MSC możliwe jest wytworzenie połączeń międzykomórkowych i stabilizacja HUVEC (*Rycina 18*).



Rycina 18 Analiza żywotności WJ-MSC, HUVEC oraz współhodowli HUVEC+WJ-MSC na powierzchni adherentnej (2D) oraz nieadherentnej (3D) po 5 dniach współhodowli. Na zielono wybarwione komórki żywe (barwnik kalceina), a na czerwono martwe (homodimer etydydy).

3.3. Analiza zależności proliferacji populacji WJ-MSC i HUVEC

W kolejnym etapie pracy poddano analizie zdolności proliferacyjne i migracyjne obu populacji. Analiza ekspresji białka Ki67 wykazała statystycznie istotnie wyższą proliferację WJ-MSC w warunkach 2D, w porównaniu do hodowli 3D. HUVEC nie proliferowały i szybko obumierały w warunkach nieadhezyjnych 3D. We współhodowli WJ-MSC i HUVEC w warunkach 2D komórki obu populacji wykazywały wyższy potencjał proliferacyjny, niż w odpowiadających im monokulturach (*Rycina 19 A*). W warunkach 3D po 2 DIV zarówno sfery WJ-MSC, jak i WJ-MSC+HUVEC zwiększyły swoją średnicę (komórki w sferze proliferowały), a wzrost ten utrzymywał się do 5 DIV (*Rycina 19 B*).



Rycina 19 Ilościowa analiza białka proliferacji Ki67 w WJ-MSC, HUVEC oraz współhodowli HUVEC+WJ-MSC w hodowli 2D oraz 3D (A). Analiza średnicy sfer uzyskanych podczas hodowli na powierzchni nieadhezyjnej WJ-MSC, HUVEC oraz współhodowli HUVEC+WJ-MSC (B). Skróty: WJ – hodowla WJ-MSC 2D, WJ sph – hodowla WJ-MSC 3D, WJ+H – współhodowla HUVEC+WJ-MSC 2D, WJ+H sph – współhodowla HUVEC+WJ-MSC 3D, H – hodowla HUVEC 2D, H sph/agr – hodowla HUVEC na powierzchni antyadhezyjnej, DIV – dzień hodowli in vitro. Statystyka: jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA, n=3, *p < 0.05, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

3.4. Ocena wpływu obecności komórek HUVEC na zmiany ekspresji genów w WJ-MSC

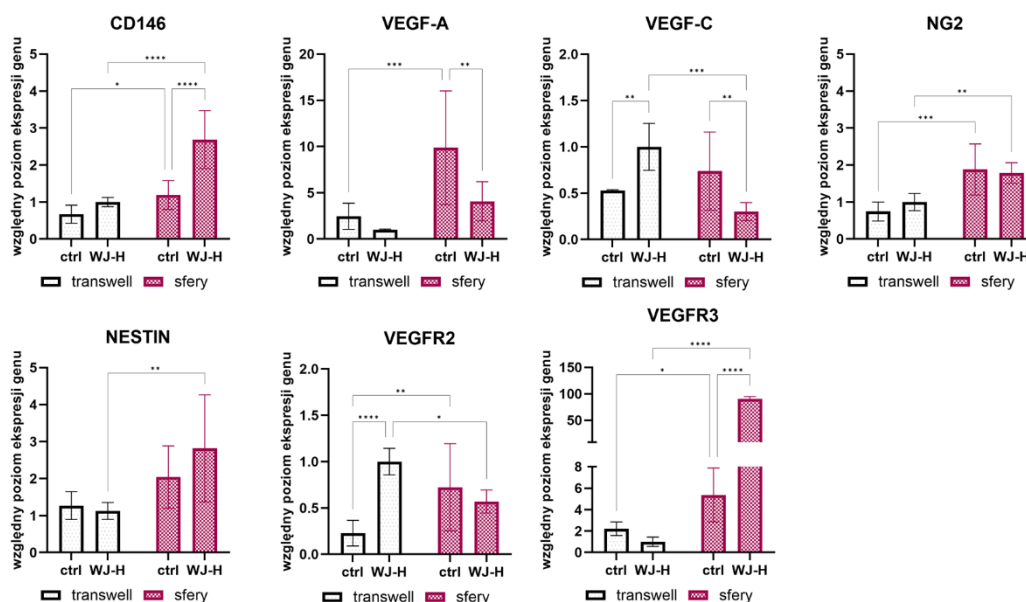
Wpływ współhodowli na zmiany ekspresji genów w WJ-MSC badano w dwóch komplementarnych modelach: (i) w hodowli 3D z zachowanym kontaktem bezpośrednim komórka-komórka oraz (ii) w hodowli z zastosowaniem systemu transwell, umożliwiającej wyeliminowanie kontaktów bezpośrednich i analizę oddziaływań parakrynnych. W obu modelach analizowano ekspresję genów związanych z angiogenezą, takich jak: *CD146*, *NESTYNA*, *VEGF-A*, *VEGFR2*, *VEGF-C* i *VEGFR3* (Rycina 20).

Analiza ekspresji genów wykazała wyraźne różnice pomiędzy modelami współhodowli. W układzie 3D odnotowano istotny wzrost ekspresji *CD146* ($2,69 \pm 0,78$ razy) oraz *VEGFR3* ($90 \pm 4,31$ razy), a także wyższą ekspresję *VEGF-A* w porównaniu z hodowlą transwell ($9,87 \pm 6,15$ vs $1 \pm 0,01$). Jednocześnie w sferach poziom ekspresji *VEGF-C* uległ obniżeniu względem kontroli ($0,3 \pm 0,09$ vs $0,73 \pm 0,4$). Odmienny efekt zaobserwowano w systemie transwell, gdzie ekspresja *VEGF-C* w WJ-MSC była istotnie wyższa niż w grupie kontrolnej ($1 \pm 0,25$ vs $0,5 \pm 0,01$), natomiast ekspresja jego receptora *VEGFR3* uległa obniżeniu. W żadnym z analizowanych modeli nie stwierdzono statystycznie istotnych zmian w ekspresji *NESTYNY* względem kontroli, choć w układzie 3D jej poziom był wyższy lecz wynik ten nie uzyskał istotności statystycznej.

Podsumowując, współhodowla w warunkach 3D, z zachowanymi kontaktami komórka-komórka, sprzyjała zwiększeniu ekspresji markerów klasycznej angiogenezy (*CD146*, *VEGFR3*, *VEGF-A*) przy równoczesnym obniżeniu *VEGF-C*, co sugeruje, że bezpośrednia interakcja MSC-HUVEC

silnie aktywuje mechanizmy angiogenezy zależne od VEGF-A/VEGFR3 i może być kluczowa dla organizacji naczyń.

Z kolei w warunkach hodowli pośredniej WJ-MSC charakteryzowały się zwiększonym poziomem ekspresji *VEGF-C* przy obniżeniu *VEGFR3*.



Rycina 20 Analiza względnego poziomu ekspresji genów WJ-MSC po współhodowli pośredniej transwell z HUVEC (kontrola WJ-MSC 2D) oraz bezpośredniej w sferach (kontrola współhodowla bezpośrednia 2D). Statystyka: dwuczynnikowa analiza wariancji ANOVA, n=3, *p < 0.05, **p<0.01, ***p < 0.001, ****p< 0.0001.

PODSUMOWANIE

WJ-MSC mogą wspierać integralność naczyń krwionośnych i procesy regeneracyjne poprzez mechanizmy związane z aktywacją angiogenezy i stabilizacją śródbłonka. Współhodowla z HUVEC indukowała w nich zwiększoną migrację oraz zmiany w ekspresji genów angiogennych. Co istotne, w modelu 3D WJ-MSC układały się przestrzennie wokół skupisk komórek śródbłonka i zwiększały ich przeżywalność, co wskazuje na ich rolę w podtrzymywaniu i stabilizacji naczyń. Jednocześnie charakter odpowiedzi WJ-MSC zależał od rodzaju interakcji – bezpośredni kontakt w 3D aktywował inne mechanizmy niż oddziaływania pośrednie, ograniczone do sygnalizacji parakrynej. Łącznie uzyskane wyniki potwierdzają potencjalny udział WJ-MSC w promowaniu utrzymania komponentu naczyniowego niszy komórkowej.

4. Ocena pośrednich i bezpośrednich interakcji pomiędzy WJ-MSc a NSC/NPC

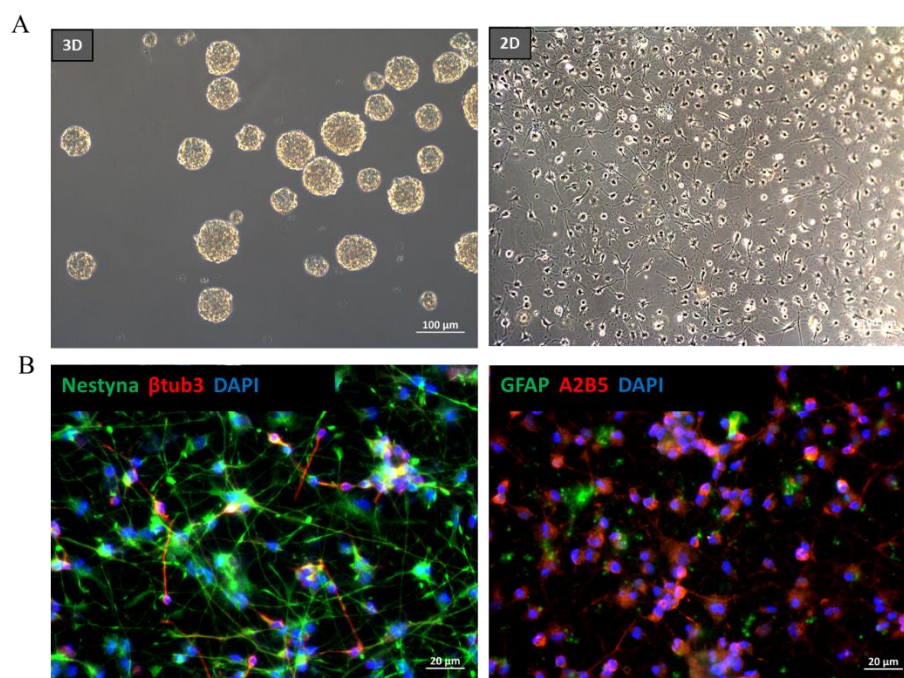
W kolejnym etapie badań skoncentrowano się na interakcjach WJ-MSc z neuralnym komponentem niszy komórkowej (NSC/NPC). MSc w tym kontekście pełnią podwójną rolę: z jednej strony stanowią narzędzie badawcze umożliwiające modelowanie mechanizmów regulujących funkcjonowanie niszy neuralnej i procesy neurogenezy, z drugiej – dzięki swoim właściwościom immunomodulacyjnym i troficznym mogą potencjalnie wzmacniać mikrośrodowisko niszy, wspierając naturalną regenerację w obrębie jednostki neurowaskularnej. Takie podejście pozwala nie tylko lepiej poznać mechanizmy biorące udział w regulacji neurogenezy, ale także potencjał terapeutyczny WJ-MSc w odbudowie niszy po uszkodzeniu ischemicznym.

Aby określić sposób oddziaływania WJ-MSc z NSC/NPC przeprowadzono analizy obejmujące:

- wzajemną organizację przestrzenną we współhodowli bezpośredniej 2D vs 3D,
- zmiany w ekspresji genów WJ-MSc oraz w sekretomie w obecności NSC/NPC w modelu współhodowli pośredniej,
- ocenę efektu neuroprotektoryjnego WJ-MSc we współhodowli ze skrawkami hipokampa szczura i NSC/NPC po deprywacji tlenu i glukozy.

4.1. Analiza fenotypu NSC/NPC

Ludzkie pierwotne NSC/NPC hodowano w formie neurosfer potwierdzając ich macierzysty charakter. Po przeniesieniu komórek na powierzchnię pokrytą białkami macierzy zewnątrzkomórkowej (lamininą lub matrigelem) obserwowano adhezję oraz zmianę ich morfologii. Komórki traciły kolisty kształt, przyjmowały morfologię wydłużoną z licznymi wypustkami i z wysokim stosunkiem jądra do cytoplazmy oraz ze średnicą ciała komórki nie przekraczającą 100µm (*Rycina 21 A*). Barwienie immunofluorescencyjne komórek potwierdziło obecność Nestyny – białka występującego w komórkach neuralnych. W hodowli obecne były również pojedyncze komórki pozytywne dla β -tubuliny III (β tub3) posiadające długie wypustki, oraz komórki rozpoczynające spontaniczne różnicowanie w kierunku progenitorów glejowych A2B5+, a sporadycznie także astrocytów GFAP+ (*Rycina 21 B*). Ze względu na heterogenność populacji zdecydowano się na użycie określenia NSC/NPC w dalszych etapach badań.



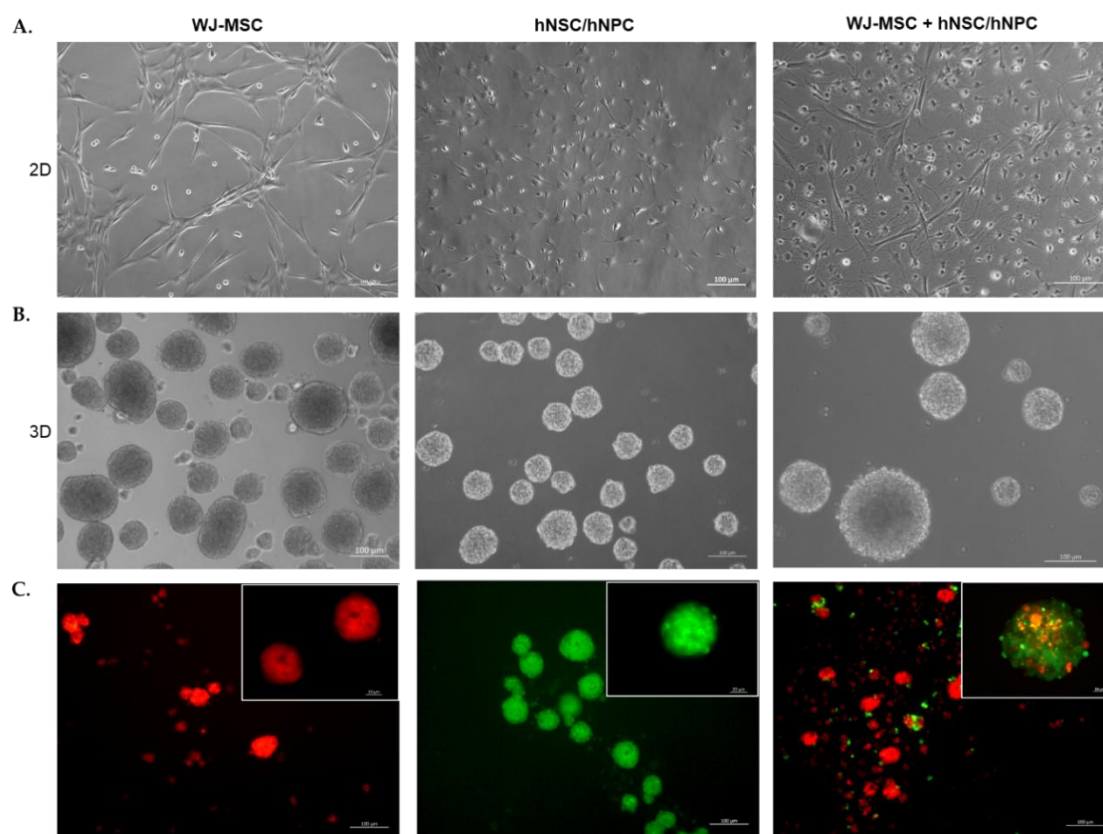
Rycina 21 Morfologia NSC/NPC w standardowych naczyniach hodowlanych (neurosfer 3D) oraz na powierzchni naczyń pokrytego lamininą (hodowla 2D) (A). Barwienie immunofluorescencyjne NSC/NPC po wysianiu na szkiełka pokryte lamininą (B).

4.2. Charakterystyka relacji przestrzennych we współhodowlach WJ-MSC + NSC/NPC

Oddziaływania bezpośrednie populacji

W przypadku współhodowli 2D komórki obu populacji zachowywały charakterystyczny dla siebie fenotyp. Układały się w sposób losowy, i tworzyły między sobą połączenia. NSC wykazywały polaryzację, kierując wypustki w stronę MSC. We współhodowli w warunkach 3D, WJ-MSC współtworzyły struktury sferoidalne z NSC/NPC. W odróżnieniu od sfer tworzonych przez WJ-MSC i HUVEC, w których komórki śródbłonne lokowały się w centralnej części

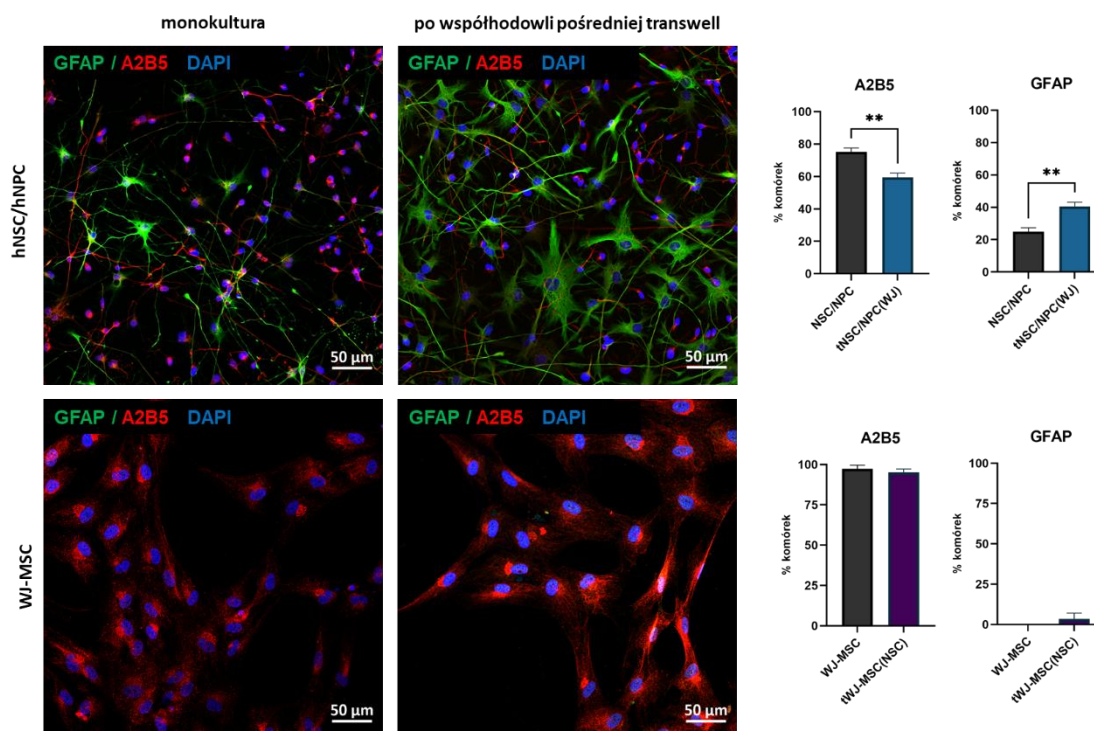
struktury, we współhodowlach z NSC/NPC w centrum znajdowały się komórki mezenchymalne, natomiast NSC/NPC otaczały je od zewnątrz (Rycina 22 A-C).



Rycina 22 Morfologia WJ-MSC, NSC/NPC oraz współhodowli WJ-MSC+NSC/NPC w warunkach 2D (**A**) oraz 3D (**B**) wraz z analizą wzajemnego położenia badanych populacji w sferach (czerwony - WJ-MSC; zielony- NSC/NPC) (**C**).

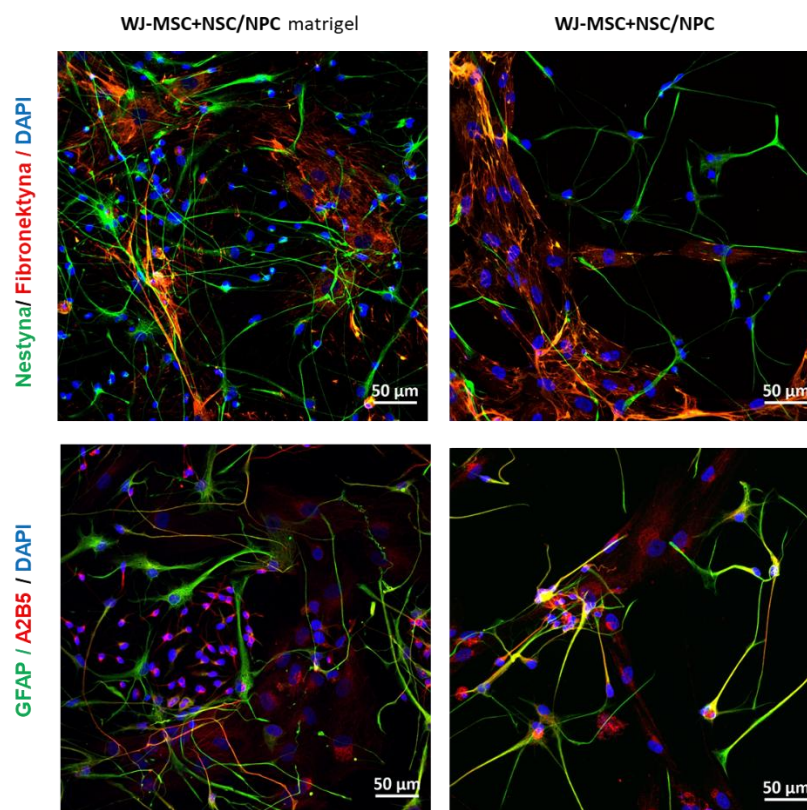
Analiza fenotypów

Zmiany fenotypowe zachodzące w obu populacjach oceniono w modelu współhodowli pośredniej (transwell). W obecności WJ-MSC, po 7 dniach współhodowli, w populacji NSC/NPC odsetek komórek A2B5-dodatnich uległ zmniejszeniu (kontrola: $75,14\% \pm 2,42$; transwell: $59,42\% \pm 2,66$), natomiast liczba komórek GFAP-dodatnich wzrosła (kontrola: $24,86\% \pm 2,42$; transwell: $40,58\% \pm 2,65$). W przypadku WJ-MSC nie stwierdzono istotnych zmian w ekspresji analizowanych markerów– komórki nie wykazywały ekspresji GFAP (kontrola: 0% ; transwell: $3,57\% \pm 3$) i zachowały stabilną ekspresję A2B5 (kontrola: $97,28\% \pm 2,36$; transwell: $95,19\% \pm 2,02$) (Rycina 23).



Rycina 23 Analiza markerów GFAP oraz A2B5 w monokulturach kontrolnych NSC/NPC i WJ-MSC oraz po współhodowli pośredniej z wykorzystaniem systemu transwell. Statystyka: test t-studenta; n=3; **p<0.01.

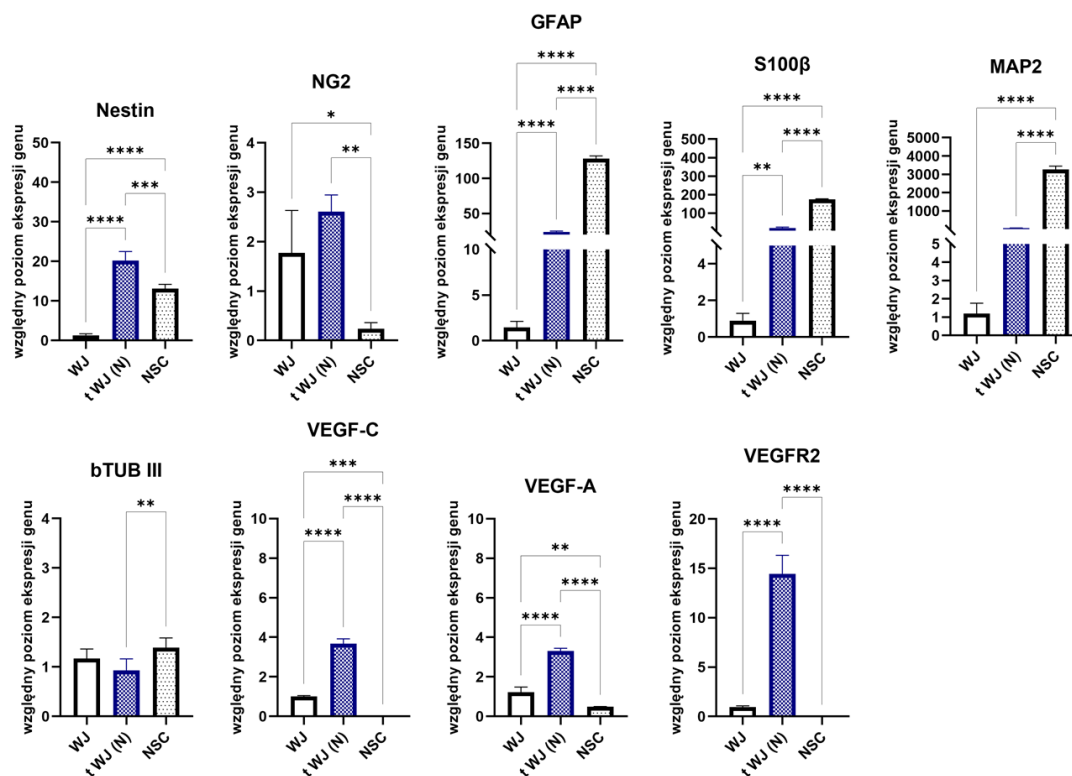
Do oceny wzajemnych relacji przestrzennych obu populacji w warunkach 2D wykorzystano barwienie na obecność fibronektyny dla WJ-MSC oraz nestyny dla NSC/NPC. Komórki hodowano na dwóch wariantach podłoża: (i) na powierzchni pokrytej matrygelem oraz (ii) pozbawionej tej warstwy. WJ-MSC zachowały w obu wariantach hodowli swój fenotyp i rosły w koloniach. NSC/NPC współhodowane z WJ-MSC na podłożu z matrygelem pokrywały równomiernie całą powierzchnię dołka, natomiast w warunkach pozbawionych matrygelu NSC/NPC preferowały adhezję do powierzchni WJ-MSC, traktując je jako naturalne podścielisko. W obu przypadkach NSC/NPC tworzyły połączenia z WJ-MSC (Rycina 24).



Rycina 24 Wzajemne ułożenie populacji WJ-MSC oraz NSC/NPC we współhodowli bezpośredniej na powierzchni pokrytej matrygelem oraz standardowej płytce hodowlanej. Komórki wybarwiono: górny panel – zielona Nestyna oraz czerwona Fibronectyna; dolny panel- zielone GFAP, czerwone A2B5. Jądra komórkowe wybarwione barwnikiem DAPI na niebiesko.

4.3. Wpływ obecności NSC/NPC na zmiany w ekspresji genów WJ-MSC

Aby określić, w jaki sposób obecność NSC/NPC wpływa na profil ekspresji genów WJ-MSC związanych z regulacją niszy neuralnej, zastosowano współhodowlę pośrednią w systemie transwell (tWJ (N)). Jako kontrolę zastosowano standardową hodowlę WJ-MSC oraz standardową hodowlę NSC/NPC. Monokultura WJ-MSC stanowiła punkt odniesienia względem populacji współhodowanej, natomiast hodowla NSC/NPC stanowiła kontrolę fenotypu neuralnego. Analiza ekspresji markerów neuralnych wykazała istotny wzrost poziomu *NESTYNY* ($20,21 \pm 2,28$ razy), *GFAP* ($23,97 \pm 1,02$ razy) oraz *SI00 β* ($19,37 \pm 4,5$ razy) w porównaniu z monokulturą WJ-MSC. Poziom tej ekspresji był istotnie niższy niż obserwowany w NSC/NPC. Dodatkowo podczas współhodowli, w populacji WJ-MSC wykazano wysoce istotny wzrost ekspresji czynników proangiogennych *VEGF-A* ($3,3 \pm 0,13$ razy) i *VEGF-C* ($3,67 \pm 0,25$ razy), a także receptora *VEGFR2* ($14,42 \pm 1,9$ razy) w porównaniu ze standardową hodowlą WJ-MSC (Rycina 25).



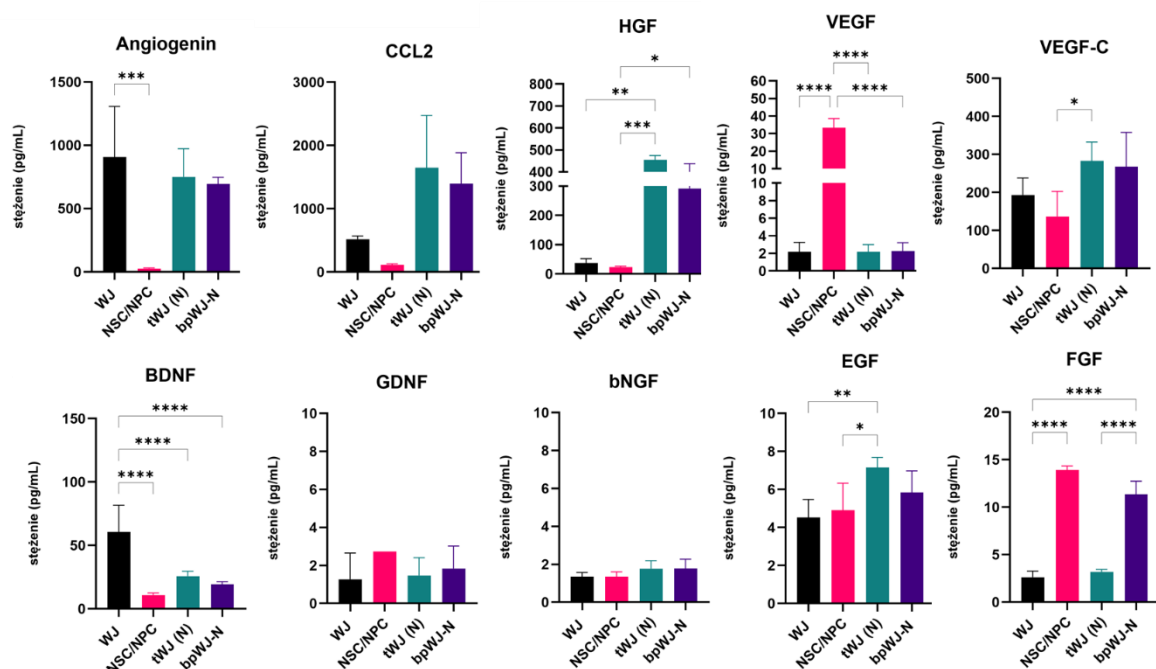
Rycina 25 Analiza ekspresji genów w WJ-MSC (WJ), WJ-MSC po współhodowli pośredniej z NSC/NPC (tWJ(N)) oraz populacji NSC/NPC (NSC). Analiza statystyczna: jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA, $n=3$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, **** $p<0.0001$.

4.4. Ocena odpowiedzi WJ-MSC na obecność NSC/NPC – analiza sekretomu

W celu określenia zmian w wydzielaniu parakrynnym WJ-MSC w odpowiedzi na obecność komórek NSC/NPC przeanalizowano sekretom w modelu zarówno współhodowli pośredniej (transwell), jak i bezpośredniej. Jako kontrole wykorzystano ponownie monokultury WJ-MSC oraz NSC/NPC (Rycina 26).

Analiza sekretomu wykazała znacznie większe wydzielanie angiogeniny przez WJ-MSC niż NSC/NPC. We współhodowlach, zarówno pośredniej, jak i bezpośredniej stężenie tego białka wciąż pozostawało na wysokim poziomie. Współhodowla, niezależnie od modelu, znacząco zwiększała sekrecję do środowiska czynników t.j. CCL2, HGF, EGF oraz VEGF-C, które w monokulturach były wydzielane na bardzo niskim poziomie. Odwrotną tendencję zaobserwowano dla czynników wzrostowych t.j. VEGF i BDNF. Podczas gdy w monokulturach NSC/NPC (VEGF) i WJ-MSC (BDNF) wydzielanie ich było istotnie wysokie, we współhodowlach poziomy obu czynników istotnie spadały. Stężenia GDNF i bNGF pozostawały we wszystkich wariantach na poziomie bardzo niskim (< 5 pg/ml).

W przypadku FGF zauważono różnice zależne od typu współhodowli: w modelu bezpośrednim poziom tego czynnika był zbliżony do obserwowanego w hodowli NSC/NPC, natomiast w systemie pośrednim utrzymywał się na poziomie charakterystycznym dla monokultur WJ-MS-C.



Rycina 26 Analiza zmian w wydzielaniu wybranych czynników. Porównanie wydzielania WJ-MS-C (WJ), NSC/NPC, współhodowli pośredniej (tWJ(N)) oraz współhodowli bezpośredniej (bpWJ-N) po 3 dniach. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA, n=4, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

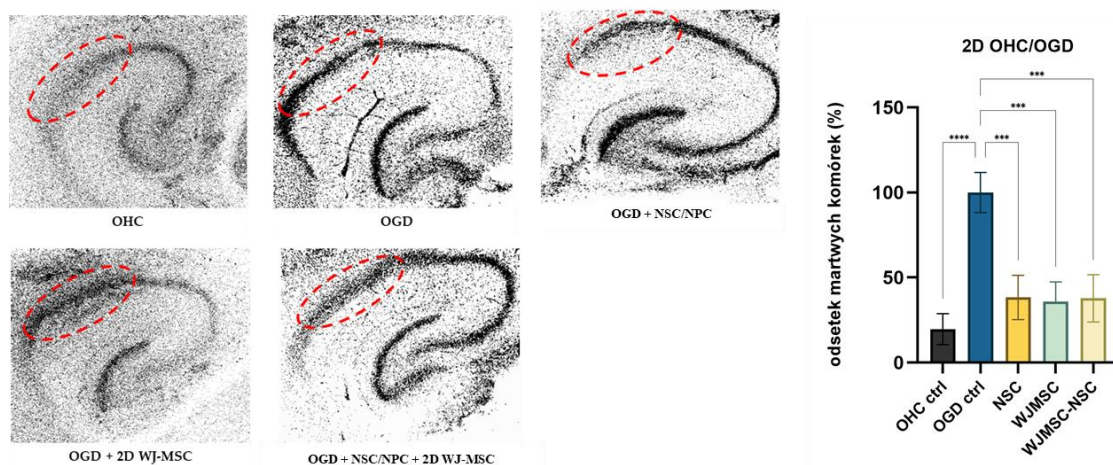
5. Wpływ obecności uszkodzonej ischemicznej tkanki nerwowej na odpowiedź komórek WJ-MSC

Współhodowle komórkowe nie odzwierciedlają w pełni mechanizmów aktywowanych w tkance nerwowej. Aby ocenić zmiany w aktywności WJ-MSC w warunkach uszkodzenia ischemicznego, w kolejnym etapie badań wykorzystano model organotypowej hodowli skrawków hipokampa (OHC). Model ten choć nie uwzględnia pełnej odpowiedzi immunologicznej oraz krążenia krwi, stanowi istotny układ do badań nad tkanką nerwową. Hodowla ta łączy w sobie zarówno komponent naczyniowy jak i neuralny co pozwala na indukcję warunków bliższych fizjologicznym niż hodowle komórkowe. Ponadto, hipokamp jest szczególnie wrażliwy na niedotlenienie i niedokrwienie, zwłaszcza w strefie CA1. W celu odtworzenia uszkodzenia ischemicznego, skrawki poddano deprywacji tlenu i glukozy (OGD).

5.1. Ocena wpływu neuroprotektoryjnego WJ-MSC w obecności NSC/NPC na uszkodzoną ischemiczną tkankę nerwową

Na tym etapie doświadczeń analizowano trzy warianty współhodowli: (i) skrawki hipokampa z WJ-MSC – w celu określenia bezpośredniego efektu neuroprotektoryjnego MSC, (ii) skrawki hipokampa z ludzkimi NSC/NPC – w celu oceny potencjału ochronnego samej niszy neuronalnej, oraz (iii) skrawki hipokampa współhodowane jednocześnie z WJ-MSC i NSC/NPC – aby określić efekt interakcji obu populacji i ich łączny wpływ na przeżywalność neuronów w strefie CA1.

Efekt neuroprotektoryjny oceniano na podstawie liczby martwych komórek w strefie CA1 hipokampa. Zarówno WJ-MSC, jak i NSC/NPC wykazały istotne działanie ochronne w porównaniu z kontrolą. Współhodowla z obiema populacjami nie spowodowała jednak nasilenia tego efektu – odsetek martwych komórek był porównywalny pomiędzy układami zawierającymi wyłącznie NSC/NPC ($38,34\% \pm 12,99$), wyłącznie WJ-MSC ($35,77\% \pm 11,72$) oraz kombinację WJ-MSC i NSC/NPC ($37,79\% \pm 13,84$). Wyniki te wskazują, że choć obie populacje komórek wykazują działanie neuroprotektoryjne, ich łączna obecność nie wywołuje efektu addytywnego (*Rycina 27*).



Rycina 27 Analiza działania neuroprotekcynnego w strefie CA1 uszkodzonego ischemicznie hipokampa szczura (zaznaczona czerwoną przerywaną linią) WJ-MSC oraz WJ-MSC w obecności egzogennych ludzkich NSC/NPC nasianych na hipokamp. Wizualizacja oraz analiza ilościowa. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA, $n = 3-4$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

5.2. Ocena wpływu obecności uszkodzonej ischemicznie tkanki nerwowej na zmiany w sekretomie WJ-MSC 2D vs 3D

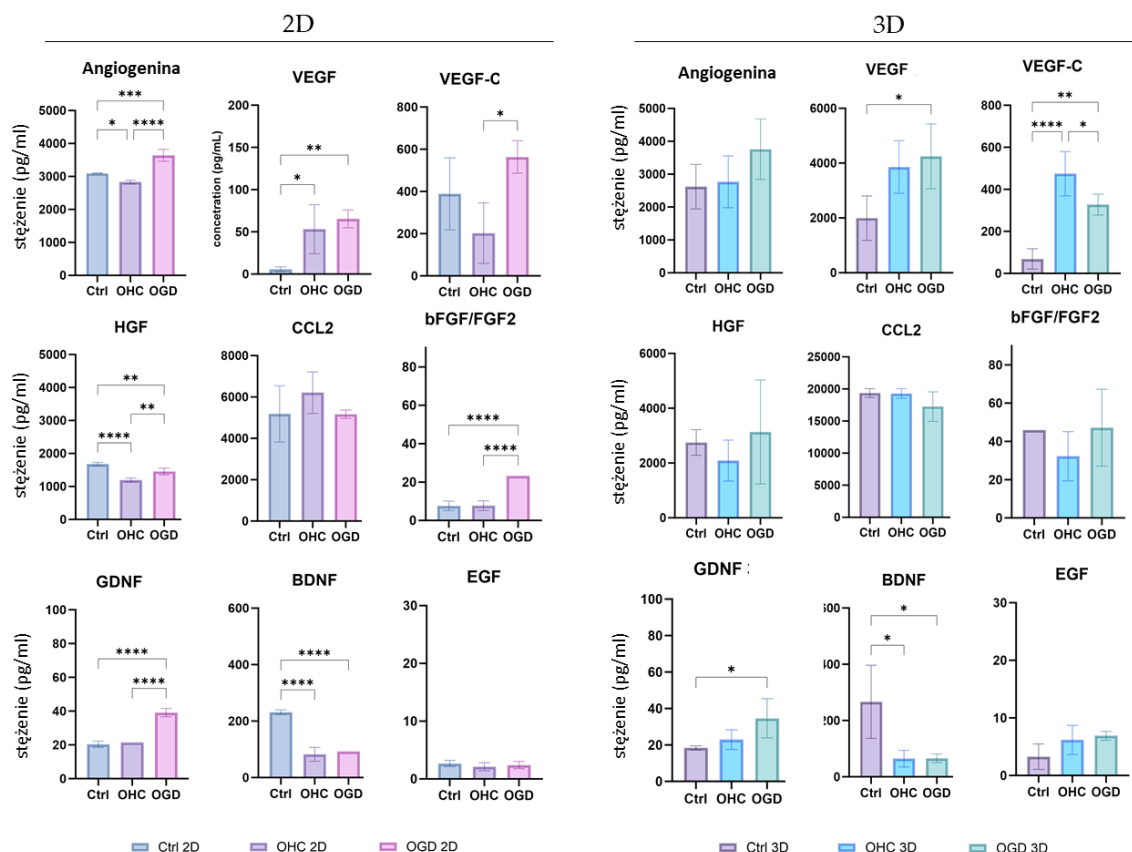
Kolejnym etapem, mającym na celu wyjaśnienie mechanizmów neuroprotekcynnego działania WJ-MSC na tkankę nerwową, była analiza ich aktywności sekrecyjnej w obecności tkanki nerwowej nieuszkodzonej oraz poddanej uszkodzeniu niedokrwinnemu. Dodatkowo, ponieważ w warunkach fizjologicznych komórki funkcjonują w układach trójwymiarowych, oceniono, czy profil sekrecyjny WJ-MSC zależy od warunków przestrzennych hodowli (2D vs 3D) (Rycina 28).

W hodowli 2D, niezależnie od stanu tkanki (prawidłowa vs. uszkodzona ischemicznie), obserwowano istotny wzrost wydzielania przez WJ-MSC czynników proangiogennych, w tym: angiogeniny, VEGF oraz VEGF-C, a także w wydzielaniu HGF. Sekrecja bFGF i GDNF była zwiększona po kontakcie z ischemicznie uszkodzoną tkanką (OGD), natomiast poziom BDNF ulegał obniżeniu. Stężenie EGF pozostawało niskie i względnie stabilne we wszystkich warunkach.

W modelu 3D profil wydzielniczy różnił się jakościowo od obserwowanego w hodowlach 2D. Zarówno w kontakcie z tkanką zdrową, jak i uszkodzoną nie stwierdzono istotnych zmian w poziomach angiogeniny, HGF, CCL2, bFGF ani EGF, natomiast istotnie wzrosła sekrecja VEGF i VEGF-C. Podobnie jak w warunkach 2D, ekspresja GDNF była wyższa po kontakcie z ischemicznie uszkodzonym hipokampem, przy równoczesnym spadku poziomu BDNF.

Obserwowano wyraźnie intensyfikację aktywności parakrynnych komórek w odpowiedzi na kontakt z uszkodzoną tkanką, przy czym komórki hodowane w układzie 3D charakteryzowały się

ogólnie wyższą sekrecją czynników proangiogennych niż w układzie 2D. Wyniki te potwierdzają, że hodowla przestrzenna lepiej odwzorowuje potencjał terapeutyczny MSC.



Rycina 28 Analiza wybranych czynników wydzielniczych w sekretomie rozpuszczalnym WJ-MSC. Analizowano komórki hodowane w formie 2D oraz 3D i ocena zmian w wydzielaniu po kontakcie ze zdrową tkanką hipokampa (OHC) oraz uszkodzoną niedokrwienne przez deprywację tlenu i glukozy (OGD). Statystyka: jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA, $n=3$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

5.3. Ocena wpływu obecności uszkodzonej ischemicznie tkanki nerwowej na zmiany w sekretomie WJ-MSC w obecności egzogennych ludzkich NSC/NPC

W kolejnym etapie doświadczeń badałam, czy obecność egzogennych ludzkich NSC/NPC – istotnego elementu niszy neuronalnej – dodatkowo moduluje profil wydzielniczy WJ-MSC w warunkach kontaktu z uszkodzoną tkanką hipokampa. Zmiany wydzielania czynników aktywnych biologicznie oceniono w dwóch punktach czasowych: odpowiedź krótka – 24h oraz długa – 7 DIV (Rycina 29). Dodanie egzogennych NSC/NPC do współhodowli z ischemicznie uszkodzoną tkanką nerwową istotnie modyfikowało profil sekrecyjny WJ-MSC. Zaobserwowano nasilenie wydzielania czynników angiogennych (angiogenina, HGF, VEGF-C), a także utrzymanie ich podwyższonego poziomu w czasie.

Łącznie wyniki te sugerują, że obecność NSC/NPC w układzie współhodowli wzmacnia i stabilizuje parakrynną odpowiedź WJ-MSC na uszkodzoną tkankę nerwową, wspierając mechanizmy angiogenezy i neuroregeneracji.

Najbardziej wyraźny efekt dotyczył BDNF, którego stężenie w układzie potrójnym skutkowało istotnym zwiększeniem jego poziomu po 24 h ($174,84 \pm 10,7$ pg/ml) w porównaniu z wariantami WJ+OGD ($65,58 \pm 14,8$ pg/ml) oraz NSC/NPC+OGD ($0,61 \pm 0,14$ pg/ml). Po 7 dniach stężenie BDNF w układzie potrójnym zmniejszyło się do $123,2 \pm 9,7$ pg/ml, lecz pozostawało wyższe niż w pozostałych grupach (WJ+OGD: $90,42 \pm 11,2$ pg/ml; NSC/NPC+OGD: $14,97 \pm 3,27$ pg/ml). W przypadku GDNF istotny wzrost stężenia obserwowano dopiero w okresie odległym od uszkodzenia, po 7 dniach współhodowli zarówno w wariancie z WJ-MSC, jak i z WJ-MSC+NSC/NPC, co może wskazywać na rolę tego czynnika w późniejszych etapach regeneracji tkanki nerwowej.

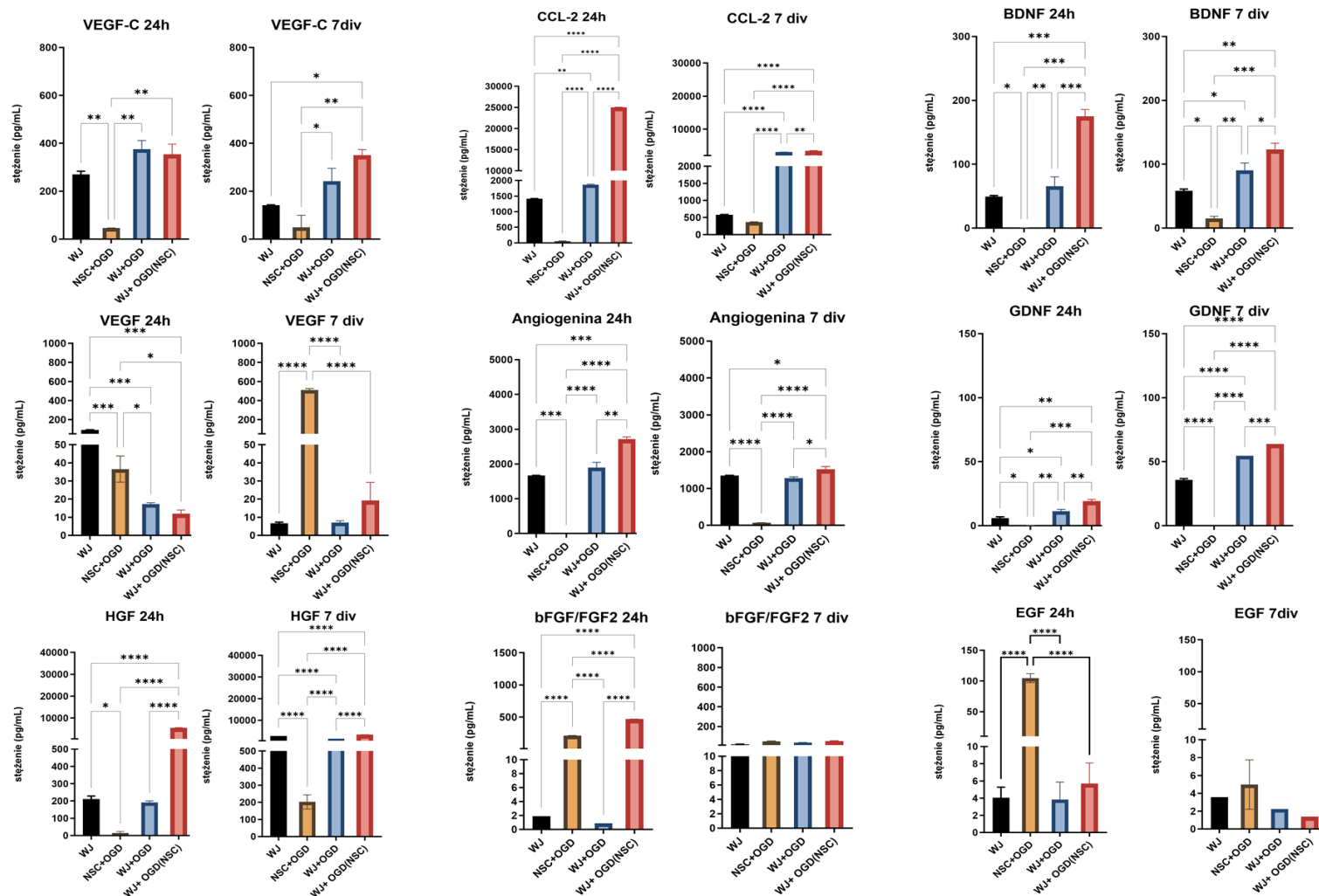
Wprowadzenie do środowiska NSC/NPC istotnie zmieniało także dynamikę sekrecji HGF, bFGF/FGF2 i EGF, prowadząc do gwałtownego, ale czasowo ograniczonego wzrostu ich poziomów.

W układzie WJ+OGD+NSC/NPC już po 24 h stężenie HGF osiągało bardzo wysoką wartość ($5538,67 \pm 88,9$ pg/ml vs $190,95 \pm 10$ pg/ml bez NSC/NPC) i utrzymywało się na podwyższonym poziomie do 7 dnia ($3333,43 \pm 5,1$ pg/ml vs $1470,96 \pm 0,3$ pg/ml bez NSC/NPC).

bFGF/FGF2 wykrywano wyłącznie w obecności NSC/NPC po 24h współhodowli (NSC/NPC+OGD: $211,36 \pm 4,46$ pg/ml; WJ+OGD+NSC/NPC: $469,43 \pm 0,4$ pg/ml). Jednak po 7 dniach jego stężenie znacząco spadło (odpowiednio $47,59 \pm 4,17$ pg/ml i $49,59 \pm 5,1$ pg/ml).

W przypadku EGF podwyższony poziom zaobserwowano tylko we współhodowli NSC/NPC+OGD po 24 h ($104,72 \pm 7,45$ pg/ml), lecz nie utrzymywał się on w czasie (7 div: $4,98 \pm 2,77$ pg/ml). W pozostałych układach wartości EGF były niższe niż 10 pg/ml, co można uznać za pomiar bliski granicy detekcji zastosowanego aparatu.

Uzyskane wyniki sugerują, że obecność NSC/NPC w układzie współhodowli wzmacnia i stabilizuje parakrynną odpowiedź WJ-MSC na uszkodzoną tkankę nerwową, wspierając mechanizmy angiogenezy i neuroregeneracji.



Rycina 29 Analiza czynników parakrynych WJ-MSC oraz NSC/NPC w kontakcie ze skrawkami hipokampa poddanymi deprywacji tlenu i glukozy (OGD) po 24h oraz 7- dniach hodowli in vitro (7div). Statystyka: jednoczynnikowa analiza wariancji; n=2-4, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001

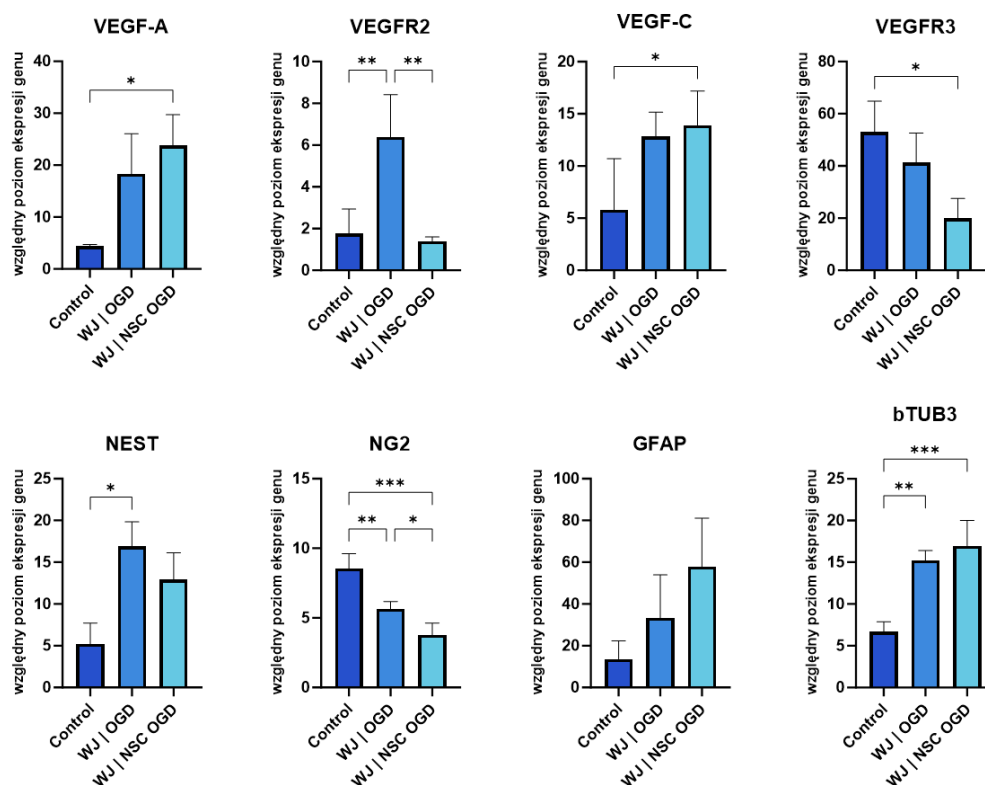
5.4. Analiza wpływu obecności uszkodzonej ischemicznie tkanki nerwowej na zmiany w ekspresji genów WJ-MSC w obecności egzogennych ludzkich NSC/NPC

Ponieważ analiza sekretomu wykazała, że obecność NSC/NPC znacząco moduluje parakrynną odpowiedź WJ-MSC na uszkodzoną tkankę nerwową, kolejnym etapem była ocena, czy zmiany te znajdują odzwierciedlenie również na poziomie transkrypcyjnym. W tym celu przeanalizowano ekspresję genów związanych z angiogenezą i neuroregeneracją w WJ-MSC współhodowanych z niedokrwiennie uszkodzonym hipokampem w obecności egzogennych NSC/NPC.

W obecności jedynie uszkodzonej tkanki nerwowej obserwowano w WJ-MSC wzrost ekspresji genów *VEGF-A* (K: $4,43 \pm 0,29$; WJ+OGD: $18,27 \pm 7,8$), *VEGF-C* (K: $5,79 \pm 4,9$; WJ+OGD: $12,81 \pm 2,39$) oraz *GFAP* (K: $13,65 \pm 8,6$; WJ+OGD: $33,28 \pm 20,6$). Dodatkowo stwierdzono istotny statystycznie wzrost ekspresji *VEGFR2*, *NESTYNY* oraz β -*TUBULINY-III* w porównaniu do WJ-MSC hodowanych w warunkach standardowych *in vitro*. Jednocześnie odnotowano obniżenie ekspresji *VEGFR3* oraz istotny statystycznie spadek ekspresji *NG2* (K: $8,56 \pm 1,06$; WJ+OGD: $5,65 \pm 0,54$).

Wprowadzenie do układu egzogennych NSC/NPC skutkowało znaczącym obniżeniem ekspresji *VEGFR2* i *VEGFR3*, przy równoczesnym nasileniu ekspresji *VEGF-A* (WJ+OGD+NSC: $23,79 \pm 5,93$) oraz *VEGF-C* ($13,91 \pm 3,27$) względem współhodowli WJ-MSC ze skrawkami hipokampa. Zaobserwowano także istotny statystycznie wzrost ekspresji β -*TUBULINY-III* ($16,97 \pm 3,04$). Ekspresja *NESTYNY* oraz *GFAP* również uległa podwyższeniu, jednak efekt ten nie osiągnął istotności statystycznej (Rycina 30).

Kontakt WJ-MSC z uszkodzoną ischemicznie tkanką nerwową indukuje ekspresję genów związanych z angiogenezą (*VEGF-A*, *VEGF-C*, *VEGFR2*), a także z różnicowaniem neuralnym (*NESTYNA*, β -*TUBULINA-III*, *GFAP*). Obecność w środowisku egzogennych NSC/NPC dodatkowo wzmacniało ekspresję genów proangiogennych (*VEGF-A*, *VEGF-C*) i neuralnych (β -*TUBULINA-III*), jednocześnie ograniczając ekspresję receptorów VEGF (*VEGFR2*, *VEGFR3*) – prawdopodobnie w mechanizmie autoregulacji. Wyniki te mogą sugerować, że NSC/NPC mogą pobudzać otoczenie do wspierania własnego przeżycia i różnicowania.



Rycina 30 Analiza ekspresji genów WJ-MSC po współhodowli pośredniej z organotypową hodowlą skrawków hipokampa poddanych deprywacji tlenu i glukozy (WJ | OGD) oraz z NSC/NPC nasianymi na skrawki hipokampa poddanych deprywacji tlenu i glukozy (WJ | NSC OGD). Kontrolę (Control) stanowiła standardowa hodowla WJ-MSC utrzymywana w jednakowych warunkach jak układ doświadczalny. Analiza statystyczna: jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA, $n=3$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Podsumowanie

Wyniki przedstawionych badań dowodzą, że WJ-MSC oraz NSC/NPC w hodowlach in vitro wchodzi z sobą w ściśle interakcje. W bezpośrednim kontakcie WJ-MSC pełnią rolę podporową dla NSC/NPC. W hodowli przestrzennej NSC/NPC adherują do struktur sferycznych utworzonych z komórek mezenchymalnych. Podobne zjawisko ma miejsce w hodowlach 2D gdzie NSC/NPC adherują do powierzchni naczyń hodowlanego niepokrytego matrygelem lub lamininą jedynie wtedy, gdy obecne są WJ-MSC. Po kontakcie pośrednim z NSC/NPC, WJ-MSC zmieniają poziom ekspresji genów dla czynników związanych z utrzymaniem niszy zarówno w kontekście naczyniowym jak i neuralnym. Ma to również swoje potwierdzenie w zmianie profilu wydzielniczego WJ-MSC po współhodowli z NSC/NPC zarówno pośredniej jak i bezpośredniej. Co więcej, WJ-MSC mają wpływ na oddziaływanie z tkanką uszkodzoną ischemicznie. Wykazują one zwiększoną ekspresję czynników głównie z grupy VEGF. Analiza wybranych czynników wykazała iż komórki zmieniają w czasie ilość wydzielanych kluczowych czynników. Dodatkowo zarówno WJ-MSC jak i WJ-MSC z NSC/NPC wykazują działanie neuroprotektoryjne. Wyniki te dają podstawę do rozważania WJ-MSC jako potencjalnych kandydatów do wsparcia niszy zarówno w warunkach fizjologicznych jak i niedokrwiennych.

6. Dyskusja

Nisza komórek macierzystych jako złożone środowisko ma na celu zarówno ochraniać KM przed szkodliwym działaniem czynników środowiskowych jak i regulować ich aktywność oraz inicjować regenerację tkanek. Endogenna neurogeneza, choć zachodzi w mózgu dorosłego człowieka, stopniowo ulega osłabieniu wraz z wiekiem, a w warunkach patologicznych - takich jak ostre niedokrwienie, choroba Alzheimera czy Parkinsona - proces ten staje się niewydolny lub ulega zaburzeniom. Obserwuje się nie tylko spadek proliferacji neuralnych komórek macierzystych, ale także zmiany w mikrośrodowisku niszy, obejmujące przewlekły stan zapalny, dysfunkcję jednostki neuro-naczyniowej oraz spadek dostępności czynników troficznych, co znacząco ogranicza zdolności regeneracyjne. Dlatego szczególnego znaczenia nabiera rola komórek wspierających, których interakcje z NSC i NVU mogą decydować o zachowaniu lub utracie zdolności regeneracyjnych niszy [70,71].

Ograniczenia w dostępności ludzkich pierwotnych linii komórek podporowych neuralnej niszy komórkowej stawiają przed nami wyzwanie w poszukiwaniu alternatywnych metod badania funkcji komórek zrębowych w tym rodzaju niszy. Co więcej, uszkodzenie NVU oraz niszy pod wpływem urazu, niedotlenienia czy niedokrwienia powoduje utratę komórek zrębu, a przez to uniemożliwia szybką regenerację mózgu. W komórkach dochodzi do zaburzenia sekretomu. Ograniczają one wydzielanie czynników takich jak BDNF, GDNF, FGF-2, VEGF. Poprzez zaburzenie sygnałów chemotaktycznych ograniczona jest migracja neuronów oraz pozostałych komórek wspierających odbudowę niszy, a obecny, lokalny stan zapalny ogranicza przeżycie nowych neuronów [72–74]. Same komórki można częściowo pobudzić endogennie, np. przez dostarczanie czynników wzrostowych czy leków, ale nie jest to wystarczające przy rozleglejszych uszkodzeniach. W takich przypadkach potrzebne jest dodatkowe, zewnętrzne wsparcie mechanizmów naprawczych oraz indukujących neurogenezę [75]. Stawia to pytanie, czy egzogenne wsparcie komórek obecnych w niszy może być wystarczające do przyspieszenia regeneracji NVU, czy jednak konieczne jest wykorzystanie dodatkowego źródła czynników troficznych. W związku z tym poszukiwane są alternatywne źródła komórek zrębu, dzięki którym jesteśmy w stanie uzyskać korzyści terapeutyczne. Dzięki swoim właściwościom, takim typem komórek mogą zostać MSC. Ze względu na dostępność, właściwości oraz aspekty etyczne doskonałym ich źródłem wydają się komórki pozyskane z galarety Whartona (WJ-MSC). Wyróżniają się one wysoką aktywnością wydzielniczą, modulowaną przez środowisko, stan fizjologiczny, a także patologiczny organizmu. Dodatkowo ze względu na brak ekspresji antygenów zgodności tkankowej klasy II (HLA-DR) są uprzywilejowane immunologicznie. Choć fizjologicznie nie występują one w mózgu, ich właściwości czynią je obiecującymi kandydatami do wspierania procesów regeneracyjnych w neuralnej niszy, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i po uszkodzeniach.

Zmiany środowiskowe regulują aktywność WJ-MSC przyczyniając się do zmian ich właściwości.

W wyniku urazu lokalne mikrośrodowisko ulega przemianom. W obrębie uszkodzonego obszaru dochodzi do niekontrolowanej hipoksji, nasilenia stanu zapalnego oraz poprzez naruszenie sieci naczyniowej - ograniczenia dostępności substancji odżywczych. Niedobór czynników takich jak glukoza czy aminokwasy może powodować stres metaboliczny dla komórek i ograniczać ich proliferację oraz indukować apoptozę. Co więcej, długotrwałe narażenie powoduje wzrost reaktywnych form tlenu, co w konsekwencji prowadzi do stresu oksydacyjnego. W literaturze można znaleźć rozbieżne dane dotyczące funkcji komórek zrębowych w warunkach stresu oksydacyjnego, niedotlenienia czy stanu zapalnego. Część prac wskazuje, że komórki te ulegają mobilizacji i zwiększają wydzielanie czynników troficznych, takich jak BDNF, VEGF czy GDNF, co może stanowić mechanizm kompensacyjny wspierający przeżycie i regenerację neuralnych komórek macierzystych (NSC) [76]. Inne badania donoszą, że przewlekła hipoksja, niedokrwienie lub procesy neurodegeneracyjne prowadzą do osłabienia aktywności wydzielniczej komórek niszy, spadku produkcji czynników neurotroficznych oraz deregulacji interakcji komórka–komórka, co w konsekwencji ogranicza zdolności regeneracyjne mózgu [74].

W poprzednich badaniach naszego zespołu wykazaliśmy, że obecny stan zapalny (indukowany cytokinami prozapalnymi IL-1 β , TNF α oraz IFN γ) powoduje wzmożoną migrację WJ-MSC oraz silne działanie chemotaktyczne w kierunku środowiska zapalnego [78]. Inne badania wykazały brak zmian w aktywności sekrecyjnej WJ-MSC w zależności od stężenia tlenu [79]. Podczas uszkodzenia dochodzi również do deprywacji czynników odżywczych. Nasza analiza wykazała, że bez względu na ilość czynników odżywczych (stężenie hPL), komórki wydzielają czynniki wzrostu takie jak HGF, GDNF czy VEGF. Środowisko o wyższej zawartości hPL indukowało silniejszą sekrecję, natomiast co ważne, ograniczona zawartość czynników nie hamowała aktywności parakrynej. Obserwacje te potwierdzają dane wskazujące, że w niekorzystnych warunkach środowiskowych takich jak niedobór składników odżywczych czy stres wywołany hipoksją, komórki mogą przeżywać i utrzymywać swoje właściwości wydzielnicze [80]. Co ciekawe, wykazano iż MSC poddane łagodnemu stresowi lub prekondycjonowaniu poprzez np. umiarkowaną hipoksję lub krótki stres oksydacyjny rozwijają lepszą migrację oraz wzmocnione właściwości regeneracyjne [81]. Przeprowadzona przez nas analiza wykazała, że WJ-MSC utrzymują zdolność do migracji i proliferacji niezależnie od dostępności substancji odżywczych w środowisku hodowli, jednak obniżone ich stężenie wiąże się ze spowolnieniem dynamiki obu procesów. Obserwacje te wskazują na możliwe ograniczenie mobilności komórek zrębowych w obszarze objętym stresem, jednak podkreślają ich ciągłą aktywność wspomagającą niszę.

WJ-MSC posiadają cechy, które mogą stabilizować śródbłonek naczyń krwionośnych.

Komórki śródbłonna naczyń krwionośnych odgrywają istotną rolę w kształtowaniu niszy i wpływają na procesy regeneracyjne zarówno bezpośrednio biorąc udział w tworzeniu BBB, jak i poprzez regulację przepływu komórek oraz molekuł regulujących funkcjonowanie niszy. W badaniach na mysich komórkach śródbłonna oraz mysich MSC wykazano, że MSC mogą stać się dobrym modelem do badania BBB, gdyż na powierzchniach kolagenowych upodobiły się do perycytów i stabilizowały komórki śródbłonna, wpływając na wzmocnienie ich integralności [78]. Taka integracja MSC może być pośrednio związana z dyskutowanym pochodzeniem tych komórek, jak również ich zdolnością do zmian fenotypowych i ekspresji markerów typowych dla komórek endotelialnych w obecności naczyń [82]. Wciąż jednak brak jest wystarczających danych dotyczących interakcji między ludzkimi komórkami obu populacji. W naszych badaniach analizowaliśmy interakcje WJ-MSC z komórkami śródbłonna pierwotnej linii pozyskanej z żyły pępowinowej (HUVEC). Charakter obserwowanych interakcji był jednak ściśle zależny od warunków przestrzennych hodowli. Hodowla 2D umożliwia analizę morfologii, proliferacji czy migracji komórek, natomiast zaburzała fizjologiczne interakcje komórka–komórka oraz komórka–ECM i nie uwidacznia naturalnych zależności przestrzennych pomiędzy badanymi populacjami [82].

Hodowlę WJ-MSC w warunkach 2D cechowała wyższa proliferacja w stosunku do hodowli 3D. Wynik ten jest zgodny z danymi literaturowymi, które opisują spowolnienie podziałów komórkowych w hodowlach przestrzennych związane z ograniczoną dostępnością tlenu i składników odżywczych. Potwierdzają to również badania, które wskazują, że komórki mezenchymalne hodowane w formie sferoidów zmieniają swój metabolizm tlenowy, zwiększając udział glikolizy [83]. Inaczej na hodowlę w warunkach przestrzennych reagują komórki śródbłonna. Ich przeżywalność w warunkach 3D była istotnie niska, a tworzone skupiska komórek bardzo szybko obumierały. Nasze obserwacje są zgodne z doniesieniami literaturowymi, które potwierdzają, że HUVEC nie posiadają zdolności do samodzielnego tworzenia stabilnych sferoidów w warunkach trójwymiarowych, a ich przeżywalność w układach 3D ulega znacznemu obniżeniu [84,85]. Natomiast współhodowla z WJ-MSC znacząco poprawiała przeżywalność komórek endotelialnych i warunkowała organizację przestrzenną sfer przypominających układy naczyniowe. Wyniki te potwierdzają kluczową rolę komórek podścieliska w podtrzymywaniu integralności i stabilizacji śródbłonna. Wzajemne interakcje komórka wspierająca - komórka endotelialna wydają się być nieodzowne dla prawidłowej regeneracji i rearanżacji naczyń. Podobne zależności zostały również opisane przez grupę Sano w badaniach z wykorzystaniem MSC pochodzących z tkanki tłuszczowej. W eksperymentach prowadzonych w systemie lab-on-a-chip, gdzie MSC współhodowano z HUVEC na matrycach kolagenowych, wykazano, że MSC lokalizują się w węzłach nowo powstających naczyń, odgrywając istotną rolę w ich aktywacji i stabilizacji [86]. Co więcej, w badaniu porównującym zdolności perycytów oraz MSC (pochodzących ze szpiku kostnego) do utrzymania integralności BBB wykazano, że komórki mezenchymalne osadzały się w pobliżu

naczyń, wspomagając ich regenerację, zarówno poprzez fizyczne uczestnictwo w strukturze, jak i efekt parakryny. W tym samym badaniu wykazano, iż MSC posiadały zwiększoną ekspresję VEGF [87]. Rodzina czynników VEGF oraz ich receptory są jedną z grup białek charakterystycznych dla komórek śródbłónka oraz wskazującą na zdolności angiogenne [88]. VEGF-A działa poprzez receptory VEGFR-1 i VEGFR-2. Choć VEGFR-1 cechuje się większym powinowactwem, to większość efektów biologicznych wynika z aktywacji VEGFR-2, natomiast VEGFR-1 pełni funkcję regulatorową, wychwytyjąc nadmiar VEGF. Aktywacja zarówno VEGFR-1, jak i VEGFR-2 prowadzi do pobudzenia proliferacji i migracji progenitorowych komórek śródbłónka, degradacji ECM oraz zwiększenia przepuszczalności naczyń krwionośnych, co ułatwia dotarcie komórek do miejsca uszkodzenia [89,90]. W przedstawionych przez nas wynikach badań możemy zauważyć zależność - WJ-MSC migrują w kierunku komórek śródbłónka (VEGFR1- pozytywnych). Obserwacja ta znajduje potwierdzenie również w wynikach testu rysy, które wskazują na zwiększoną aktywność migracyjną WJ-MSC w kierunku HUVEC. Można przypuszczać, że zaobserwowany efekt jest związany z oddziaływaniem czynników parakrynych, w szczególności sygnałów związanych z osią VEGF-VEGFR1. Zdolność WJ-MSC do reagowania na sygnały wytwarzane przez komórki śródbłónka może stanowić istotny mechanizm sprzyjający ich udziałowi w regeneracji naczyń oraz w procesach naprawczych.

Analiza ekspresji genów związanych z angiogenezą wykazała istotne różnice pomiędzy modelem współhodowli 3D, a systemem transwell, co podkreśla znaczenie architektury hodowli i sposobu kontaktu między komórkami. W warunkach 3D zaobserwowaliśmy zwiększoną ekspresję CD146, VEGF-A oraz VEGFR3 w porównaniu do hodowli pośredniej. CD146, występujące w połączeniach śródbłonkowych a także jest cząsteczką występującą na perycytach. Pełni ona rolę koreceptora dla VEGFR2 [91], a jej podwyższona ekspresja w hodowli bezpośredniej może wskazywać na aktywację mechanizmów proangiogennych aktywowanych poprzez bezpośrednie kontakty komórkowe. Jednocześnie w kontakcie bezpośrednim obniżała się ekspresja VEGF-C, co może wynikać z jego intensywnego zużycia lub działania sprzężenia zwrotnego ujemnego. Bezpośrednia interakcja WJ-MSC z HUVEC potencjalnie może promować ich różnicowanie w kierunku perycytów. Dodatkowo, warunki 3D mogą wzmacniać angiogenezę poprzez indukcję lokalnej hipoksji wewnątrz struktur. Hipoksja jest znanym czynnikiem proangiogenным, przeciwapoptotycznym oraz migracyjnym, a także wspiera utrzymywanie macierzystości [60,66,88].

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują, iż WJ-MSC podobnie jak MSC izolowane z innych źródeł wchodzi w interakcje z komórkami śródbłónka i mogą polepszać jego funkcjonowanie. Co istotne, w warunkach przestrzennych zaobserwowaliśmy zjawisko przypominające samoorganizację: HUVEC lokalizowały się w centralnych częściach struktur, natomiast WJ-MSC układały się peryferyjnie, tworząc warstwę wspierającą. Taka organizacja przestrzenna odzwierciedla architekturę naczyń in vivo i dodatkowo podkreśla potencjał WJ-MSC w modelowaniu interakcji w sniszy, jak i badaniu mechanizmów regeneracji tkanki w tym również NVU.

WJ-MSC zmieniają swoje właściwości w obecności NSC/NPC co czyni je potencjalnym czynnikiem wspierającym nisze w dojrzałym mózgu.

Ludzkie NSC stanowią najcenniejszą grupę komórek wchodzących w skład niszy komórkowej. Ze względu na swój charakter i umiejscowienie niezwykle trudne jest pozyskanie tych komórek do badań podstawowych. Wiedza na temat ich biologii i zrozumienie mechanizmów biorących udział w utrzymaniu regeneracji mózgu stanowi ogromną bazę, którą można wykorzystać w terapii wielu chorób OUN. Dotychczasowa literatura w przeważającej mierze opiera się na badaniach z wykorzystaniem modeli zwierzęcych (myszy, szczury), które ze względu na istotne różnice międzygatunkowe, jedynie w ograniczonym stopniu odzwierciedlają relacje zachodzące w ludzkiej niszy. Badanie porównawcze NSC pochodzących od myszy, szczura i człowieka *in vitro* wykazało, że w zależności od źródła komórek zmieniają się ich właściwości migracyjne, proliferacyjne czy potencjał do różnicowania, a dane uzyskane na modelach zwierzęcych nie mogą być bezpośrednio przenoszone na warunki ludzkie [92]. Z tego względu badania prowadzone na ludzkich komórkach wydają się niezbędne do pełnego zrozumienia mechanizmów regulujących funkcjonowanie niszy i procesów regeneracyjnych w mózgu.

NSC w odróżnieniu od MSC czy HUVEC w sposób spontaniczny tworzą w warunkach *in vitro* sfery. Jest to również metoda pozwalająca wyeliminować komórki zróżnicowane. Tym niemniej, nie jest to populacja homogenna, gdyż zawiera zarówno komórki macierzyste, jak również progenitory komórek neuralnych [93]. Ze względu na potencjalnie mieszany charakter neurosfer w pracy używano do w/w opisywanej populacji określenia NSC/NPC. W naszych doświadczeniach NSC/NPC współtworzyły z komórkami mezenchymalnymi sfery, w których, w odróżnieniu od współhodowli z HUVEC, rdzeń stanowiła populacja WJ-MSC natomiast na jej powierzchni lokalizowały się NSC/NPC. Z danych literaturowych wiadomo, że NSC/NPC chętnie adherują do powierzchni wysokobiałkowych takich jak np. laminina, stąd też można przypuszczać iż NSC/NPC wykorzystują komórki mezenchymalne posiadające na swojej powierzchni szereg cząstek j i białek cytoszkieletowych jako macierz. Fibronektyna jest jednym z białek cytoszkieletowych występujących w MSC. Posiada ona potwierdzone działanie adhezyjne oraz wspierające migrację NSC [94]. Nasze obserwacje w modelu współhodowli 2D, również potwierdziły preferencyjną adhezję NSC/NPC do komórek WJ-MSC wykazujących obecność fibronektyny. Z literatury wiadomo również, że brak mitogenów w środowisku i wymuszenie adhezji komórek poprzez zastosowanie pokrycia powierzchni naczynia hodowlanego białkami wpływa również na różnicowanie NSC [95]. Oprócz oddziaływań bezpośrednich związanych z ekspresją białek macierzy t.j. fibronektyna, mogą również wpływać na różnicowanie NSC/NPC poprzez wydzielanie czynników sygnałowych [96–98]. Te mechanizmy znacznie łatwiej można ocenić w hodowli pośredniej, w której pozbywamy się kontaktów komórka-komórka. Podczas takiej analizy zaobserwowaliśmy, że w populacji NSC/NPC, hodowanej we wspólnym środowisku z WJ-MSC, zwiększał się udział komórek GFAP-pozytywnych, a zmniejszał odsetek komórek A2B5- pozytywnych.

Obserwowane zmiany sugerują, że WJ-MSc poprzez wydzielane czynniki sygnałowe mogą promować różnicowanie NSC/NPC w kierunku astrogleju kosztem linii oligodendroglejowej, co niestety możemy obserwować po uszkodzeniu mózgu. Zjawisko to było już wcześniej opisywane i wiązane z sekrecją czynników troficznych, takich jak LIF, CNTF czy BMP2/4, które aktywują szlak JAK/STAT3 oraz SMAD, sprzyjając ekspresji GFAP i hamując różnicowanie w kierunku oligodendrocytów [99]. Wzrost udziału komórek GFAP+ przy jednoczesnym spadku odsetka komórek A2B5+ wskazuje więc, że sygnały parakryne MSC nie tylko wspierają przeżywalność NSC/NPC, lecz także modulują ich różnicowanie, przesuwając równowagę w stronę fenotypu astrocytarnego. Dotychczas brak jest doniesień literaturowych, z którymi moglibyśmy w pełni skonfrontować przytoczone wyniki. Dostępne prace pokazujące, że MSC lub ich sekretom, mogą zwiększać odsetek astrocytów (GFAP+) w kulturach NSC/NPC były prowadzone z zastosowaniem komórek pochodzących od gryzoni [100]. Z drugiej strony, istnieją również doniesienia, prowadzone z zastosowaniem ludzkich MSC i zwierzęcych NSC/NPC, pokazujące hamowanie astroglizy przez inhibicję szlaku BMP/SMAD [101] co podkreśla zależność efektu od źródła komórek, warunków hodowli oraz rodzaju kontaktu pomiędzy komórkami (bezpośredni, czy jedynie parakrynni).

W celu sprawdzenia, czy obecność NSC/NPC zmienia fenotyp i właściwości wydzielnicze WJ-MSc, przeprowadzono dalsze analizy.

Obecność NSC/NPC wpływa na zmiany w fenotypie WJ-MSc zmieniając ich profil sekrecyjny na sprzyjający utrzymaniu niszy oraz regeneracji po urazie.

Współhodowla pośrednia WJ-MSc z NSC/NPC wykazała zmiany jakie zaszły również w fenotypie WJ-MSc pod wpływem wyłącznie rozpuszczalnych czynników sygnałowych. W WJ-MSc zaobserwowaliśmy istotny wzrost ekspresji markerów takich jak *NESTYNA*, *GFAP* oraz *S100β*. Wyniki te wskazują, że mikrośrodowisko neuralne oddziałuje na WJ-MSc, zmieniając ich fenotyp na sprzyjający komórkom układu nerwowego. Podobną zmianę fenotypu MSC pod wpływem pożywek wzbogaconych w czynniki neurogenne lub w obecności tkanki nerwowej opisywały również inne grupy badawcze, przy czym efekt ten był nasilony w hodowlach prowadzonych w warunkach 3D [97]. Podobne zjawisko odnotowano również w hodowlach MSC wzbogacając standardową pożywkę hodowlaną PMR lub stosując sam PMR, gdzie MSC zaczęły wykazywać ekspresję markerów neuronalnych zarówno na poziomie białkowym, jak i genowym [98][99]. Jednakże, w żadnym z w/w badań nie wykazano funkcjonalnego zróżnicowania MSC - aktywności elektrofizjologicznej. Opisywane zjawisko przypomina raczej tzw. mimikrę fenotypową i tak również interpretujemy uzyskane przez nas wyniki. Szczególnie, że poziom ekspresji markerów neuralnych oznaczony w WJ-MSc pozostawał istotnie niższy w porównaniu z NSC/NPC. Współhodowla obu populacji wpłynęła również na aktywację szlaków proangiogennych w WJ-MSc, o czym świadczy podwyższona ekspresja

VEGF-A, *VEGF-C* oraz *VEGFR2*. *VEGF-C* wykazuje również działanie aktywujące NSC, co jest związane z obecnością jego receptora- *VEGFR3* na powierzchni tych komórek. Badania wskazują, że nadekspresja *VEGFR3* sprzyja aktywacji NSC, natomiast jego blokowanie prowadzi do zmniejszenia liczby aktywnych komórek i utrzymania ich w stanie spoczynku [102]. Nasze wyniki wykazały, że WJ-MSC, na skutek obecności NSC/NPC w środowisku, wykazują wyższą ekspresję czynnika *VEGF-C*, przy obniżonej ekspresji jego receptora. Zbieżne rezultaty uzyskano w analizie sekretomu, w której stwierdzono podwyższone stężenie *VEGF-C* w pożywce zarówno w warunkach współhodowli pośredniej, jak i bezpośredniej. Obserwacje te sugerują, że WJ-MSC, poprzez modulację mikrośrodowiska, mogą sprzyjać wyjściu NSC ze stanu spoczynku, co w konsekwencji prowadzi do ich dalszej aktywacji.

Dalsza analiza porównawcza sekretomu współhodowli pośredniej i bezpośredniej w naszych badaniach wykazała istotne różnice w profilu wydzielniczym, zależne od rodzaju interakcji między komórkami. W obu modelach stwierdzono istotne zwiększenie wydzielania HGF, EGF, *VEGF-C* oraz *CCL2*. Potwierdza to aktywację mechanizmów parakrynnych i synergistyczne działanie obu populacji komórek. Szczególnie podwyższona sekrecja HGF i *VEGF-C* może mieć znaczenie dla równoczesnej stymulacji angiogenezy i neuroprotekcji. Odmienną zależność obserwowano w przypadku FGF, którego poziom był zależny od rodzaju kontaktu komórkowego: w układzie bezpośrednim odpowiadał profilowi NSC/NPC, podczas gdy w hodowli pośredniej był zbliżony do profilu wydzielniczego monokultury WJ-MSC. Wynik ten wskazuje, że typ interakcji – kontakt bezpośredni lub parakrynnny – ma kluczowe znaczenie dla regulacji sekrecji komórek. Potwierdzają to doniesienia innych grup badawczych, zgodnie z którymi MSC współhodowane z NSC wspierają ich przeżycie oraz zachowanie „macierzystości”, przy czym efekty te są mniej wyraźne w modelach opartych wyłącznie na pożywce kondycjonowanej [103].

Uzyskane wyniki sugerują, że WJ-MSC w obecności NSC/NPC mogą pełnić rolę komórek wspierających zarówno procesy neurogenezy, jak i angiogenezy, które odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu integralności i regeneracji NVU.

WJ-MSC w obecności uszkodzonej tkanki nerwowej wykazują wzmożone działanie neuroprotektcyjne oraz proangiogenne

Pomimo wykazanej aktywności proangio- oraz neurogennej, przedstawione modele nie uwzględniają złożonego środowiska niszy ani jednostki naczyniowo-nerwowej. Modelem pośrednim pomiędzy badaniami *in vitro* a *in vivo* są hodowle organotypowe. Uwzględniają one bardziej złożoną architekturę tkanki niż standardowe hodowle komórkowe *in vitro*. W przypadku badań OUN, często wykorzystuje się skrawki hipokampa. Hipokamp jest strukturą niezwykle wrażliwą na niedotlenienie i niedokrwienie. Podczas niedokrwienia mózgu jest jednym z pierwszych obszarów narażonych na uszkodzenie. Z uwagi na obecność w jego obszarze jednej z nisz neuralnych oraz licznych jednostek

naczyniowo-nerwowych stanowi badań nad interakcjami zachodzącymi w mózgu [104,105]. W naszych wcześniejszych badaniach wykazaliśmy działanie neuroprotektoryjne WJ-MSC. Wcześniej, podobne obserwacje odnotowano również w przypadku współhodowli całych fragmentów galarety Whartona współhodowanych z tkanką uszkodzoną. Zaobserwowano również, że w przypadku hodowli komórkowych im wcześniejszy pasaż tym komórki wykazywały silniejsze właściwości neuroprotektoryjne [62]. Podobną tendencję zaobserwowano także w zakręcie zębatym hipokampa (DG) mózgów szczurów w badaniach *in vivo*. Po wstrzyknięciu BM-MSC wykazano zwiększoną przeżywalność i różnicowanie neuronów i astrocytów [106]. Przedstawione w tej pracy wyniki potwierdziły zwiększone przeżycie komórek neuralnych w strefie CA1 hipokampa po pośrednim oddziaływaniu z WJ-MSC. W naszych badaniach podjęliśmy kolejny temat, czy profil wydzielniczy WJ-MSC ulega modyfikacji w obecności skrawków hipokampa w warunkach hodowli 2D vs. 3D. Dynamika zmian w wydzielaniu w obu typach hodowli wykazywała zbliżoną tendencję. Kontakt z samą tkanką nerwową indukował wzrost wydzielania czynników aktywnych biologicznie, natomiast kontakt z tkanką uszkodzoną nasilał ten efekt. Wyjątek stanowił czynnik BDNF, który to uległ istotnemu zmniejszeniu. W warunkach przestrzennych odnotowano wyższe stężenie czynników proangiogennych takich jak VEGF, CCL2 czy HGF, może to wynikać z indukcji środowiska hipoksyjnego wewnątrz struktur sferycznych. Niezależnie od tego, czy proces ten ma charakter fizjologiczny, czy patologiczny, hipoksja poprzez czynnik HIF-1 może uczestniczyć w tworzeniu naczyń krwionośnych poprzez synergiczne korelacje z innymi czynnikami proangiogennymi, takimi jak VEGF [107,108]. Ponadto, utrzymywanie MSC w formie przestrzennej powoduje utrzymanie ich macierzystości przez dłuższy czas, dzięki czemu komórki mogą być bardziej aktywne terapeutycznie [109,110].

Ocena wpływu warunków przestrzennych hodowli na właściwości MSC była już przedmiotem badań innych autorów. Wykazano, że hodowla MSC w układach trójwymiarowych sprzyja zwiększonej sekrecji czynników troficznych i proangiogennych, w tym HGF, VEGF oraz ICAM-1, w porównaniu z klasyczną hodowlą 2D [111] co potwierdziło nasze wyniki. Grupa Gangadaran i wsp. wykazała, że MSC hodowane w warunkach 3D wydzielają więcej białek proangiogennych, a pozyskana pożywka kondycjonowana silniej stymuluje migrację i tworzenie struktur naczyniowych przez komórki śródbłonna niż pożywka z hodowli 2D [112]. Również Jalilian i wsp. opisali, że EV izolowane z MSC hodowanych w 3D charakteryzują się większą różnorodnością fenotypową i wyższym potencjałem neurotroficznym, m.in. poprzez stymulację wydłużania i rozgałęziania neurytów [113]. Z kolei inne badania sugerują, że nie wszystkie funkcje MSC są nasilone w warunkach 3D. Kusuma i wsp. wykazali, że w odpowiedzi na stymulację IFN- γ aktywnośćIDO była wyższa w hodowlach 2D, co wskazuje, że pewne właściwości immunomodulacyjne mogą być lepiej utrzymywane w tradycyjnych systemach [114]. Z kolei Pischitta i wsp. wykazali, że sekretom MSC w modelu 3D uszkodzenia kory zmniejszał śmierć komórek i wspierał reorganizację neuronalną [115]. Pokazuje to, że przewaga 3D nad 2D nie jest uniwersalna i może zależeć od rodzaju analizowanego mechanizmu. Włączenie do współhodowli

fragmentów hipokampa, jak w naszym modelu, pozwala na ocenę interakcji w bardziej złożonym mikrośrodkowisku tkankowym, z zachowaniem części architektury neuronalnej i glejowej. Umożliwia również analizę wpływu uszkodzonej tkanki na WJ-MSK.

W kolejnym etapie postanowiono dodać do układu eksperymentalnego NSC/NPC pochodzenia ludzkiego, aby w złożonym mikrośrodkowisku tkanki nerwowej ocenić wpływ ludzkich sygnałów neuronalnych na WJ-MSK. Takie podejście pozwala przeanalizować, czy czynniki wydzielane przez ludzkie NSC/NPC są w stanie modulować właściwości MSK, podobnie jak wcześniej wykazano odwrotny kierunek oddziaływania MSK na komórki nerwowe [116]. Analiza sekretomu przeprowadzona w ostrym i odległym czasie od uszkodzenia ischemicznego wykazała, że obecność ludzkich NSC/NPC zmieniała odpowiedź WJ-MSK obserwowaną w obecności samej szczurzej tkanki nerwowej. Efekt ten był głównie zauważalny w przypadku czynników neurogennych takich jak BDNF, GDNF czy też bFGF zarówno krótko po uszkodzeniu (24h) jak i po 7 dniach obserwacji. Co ciekawe, obecność w środowisku tkanki nerwowej ludzkich NSC/NPC aktywowała wydzielanie BDNF, czego nie obserwowano w obecności samej tkanki. Może to sugerować, że BDNF odgrywa bardziej znaczącą rolę w późniejszych etapach regeneracji niszy neuronalnej, zgodnie z doniesieniami wskazującymi na jego udział w długofalowych procesach plastyczności i przeżycia neuronów [117,118]

Istnieją doniesienia, że WJ-MSK wykazują spontaniczną ekspresję markerów neuronalnych takich jak GFAP, S100 β czy NG2 [119], a obecność tkanki nerwowej wpływa na dodatkowe zwiększenie ekspresji genów neuronalnych takich jak NG2 czy NF200 [62]. Nasza analiza potwierdziła ogólny wzrost ekspresji genów neuronalnych w tych komórkach, jednak odnotowaliśmy obniżenie poziomu NG2 przy jednoczesnym nasileniu ekspresji GFAP. Obecność ludzkich NSC/NPC potęgowała te zmiany, co może sugerować, że WJ-MSK łatwiej nabywają cech bliższych komórkom astrocytarnym niż oligodendrocytom. Podobną tendencję - zwiększoną ekspresję GFAP oraz S100 β po współhodowli pośredniej z NSC/NPC - obserwowano także w badaniach *in vitro*, co może wskazywać, iż WJ-MSK są w stanie wspomagać astrocyty w utrzymaniu niszy neuronalnej. Zaobserwowana ekspresja markerów astrocytarnych w WJ-MSK może odzwierciedlać ich zdolność do adaptacji fenotypowej i częściowego naśladowania funkcji astrocytów. Ponieważ jednym z kluczowych zadań astrocytów w warunkach uszkodzenia mózgu, obok właściwości immunomodulacyjnych, jest aktywacja procesów naprawy BBB [41,120,121], obecność podobnych cech w WJ-MSK sugeruje, że komórki te mogą wspierać endogenne mechanizmy regeneracyjne poprzez wydzielanie czynników proangiogennych (VEGF-A, VEGF-C) i neurotroficznych. W takim ujęciu WJ-MSK nie zastępują komórek nerwowych, lecz wzmacniają aktywność astrocytów i pośrednio wspomagają odbudowę jednostki naczyniowo-nerwowej.

Dalsze perspektywy w badaniu interakcji w niszy neuralnych komórek macierzystych z wykorzystaniem WJ-MSC

W oparciu o uzyskane przez nas wyniki, jak również dane literaturowe, wskazujące na stosunkową odporność WJ-MSC na deprywację środowiskową oraz ich zdolność do wspierania procesów angiogenezy i modulowania NSC/NPC, dalsze badania planujemy skoncentrować na analizie mechanizmów komunikacji międzykomórkowej. W tym celu planujemy badanie frakcji rozpuszczalnej sekretu tzw. „*free secretom*”, pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, które przenoszą istotne sygnały molekularne, jak również mechanizm tworzenia nanotubuli, który umożliwia bezpośrednie przekazywanie organelli, mRNA i białek, co może odgrywać ważną rolę w regulacji przeżycia NSC. Rozwój bardziej zaawansowanych modeli np. organoidów mózgu czy systemów NVU/BBB-on-a-chip, pozwoli jeszcze wierniej odtworzyć warunki panujące w niszy neuralnej i lepiej zrozumieć terapeutyczny wpływ WJ-MSC na integralność NVU. Zastosowanie warunków trójwymiarowych w fizjologicznym stężeniu tlenu (5%) może dodatkowo wzmocnić ich potencjał proangiogeny. Szczególnie istotne wydają się być także badania nad interakcjami z mikroglejem i mechanizmami immunomodulacyjnymi, które mogą determinować długofalowe efekty neuroprotektyjne i regeneracyjne. Lepsze poznanie tych złożonych szlaków komunikacji pozwoli w przyszłości projektować bardziej translacyjne modele *in vitro* oraz przyczyni się do rozwoju skutecznych strategii terapeutycznych ukierunkowanych na regenerację jednostki naczyniowo-nerwowej.

7. Wnioski

1. Analiza wykazała, że dostęp do czynników troficznych nie wpływał na fenotyp ani ekspresję markerów WJ-MSC, natomiast w sposób dawkozależny modulował ich aktywność biologiczną, zwiększając proliferację, migrację oraz sekrecję czynników troficznych (m.in. HGF i BDNF). Ponieważ środowisko ubogie w czynniki troficzne, np. po niedokrwieniu, ogranicza zdolności sekrecyjne komórek zrebowych, dodatkowe dostarczenie tych czynników z zewnątrz może być niezbędne do wzmocnienia naturalnych, niewystarczających mechanizmów naprawczych.
2. Udowodnione interakcje WJ-MSC z komórkami śródbłona naczyń krwionośnych potwierdzają ich potencjalną rolę jako wsparcie strukturalne, jak i parakryne podczas odbudowy sieci naczyń po uszkodzeniu. Układ przestrzenny, będący bliższym fizjologicznie niż model 2D, sprzyja silniejszej aktywacji genów proangiogennych, co wskazuje na silniejszy potencjał WJ-MSC in vivo i otwiera nową ścieżkę do wykorzystania tego modelu w warunkach in vitro w kontekście naczyniowym niszy.
3. WJ-MSC modyfikują swój profil sekrecyjny i fenotyp w odpowiedzi na kontakt z NSC/NPC oraz tkanką nerwową, co w warunkach fizjologicznych i niedokrwienych sprzyja neurogenезie i waskulogenезie, a odpowiedź ta jest dodatkowo modulowana przez obecność ludzkich NSC/NPC.

8. Bibliografia

1. Schofield, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **1978**, *4*, 7–25.
2. Méndez-Ferrer, S.; Michurina, T. V.; Ferraro, F.; Mazloom, A.R.; MacArthur, B.D.; Lira, S.A.; Scadden, D.T.; Ma'ayan, A.; Enikolopov, G.N.; Frenette, P.S. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **2010**, *466*, 829–834, doi:10.1038/nature09262.
3. Scadden, D.T. Nice neighborhood: Emerging concepts of the stem cell niche. *Cell* **2014**, *157*, 41–50, doi:10.1016/j.cell.2014.02.013.
4. Jones, D.L.; Wagers, A.J. No place like home: Anatomy and function of the stem cell niche. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 11–21, doi:10.1038/nrm2319.
5. Brunet, A.; Goodell, M.A.; Rando, T.A. Ageing and rejuvenation of tissue stem cells and their niches. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2023**, *24*, 45–62, doi:10.1038/s41580-022-00510-w.
6. Gooi, L.M.; Gopalakrishnan, J. Regulation of Stem Cells in Their Niche. *Curr. Stem Cell Reports* **2016**, *2*, 282–289, doi:10.1007/s40778-016-0048-2.
7. Altman, J. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat. Rec.* **1963**, *145*, 573–591, doi:10.1002/AR.1091450409.
8. Alcázar, A.; Regidor, I.; Masjuan, J.; Salinas, M.; Álvarez-Cermeño, J.C. Induction of apoptosis by cerebrospinal fluid from patients with primary-progressive multiple sclerosis in cultured neurons. *Neurosci. Lett.* **1998**, *255*, 75–78, doi:10.1016/S0304-3940(98)00708-3.
9. Ernst, A.; Alkass, K.; Bernard, S.; Salehpour, M.; Perl, S.; Tisdale, J.; Possnert, G.; Druid, H.; Frisén, J. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell* **2014**, *156*, 1072–1083, doi:10.1016/j.cell.2014.01.044.
10. Boldrini, M.; Fulmore, C.A.; Tartt, A.N.; Simeon, L.R.; Pavlova, I.; Poposka, V.; Rosoklija, G.B.; Stankov, A.; Arango, V.; Dwork, A.J.; et al. Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging. *Cell Stem Cell* **2018**, *22*, 589–599.e5, doi:10.1016/j.stem.2018.03.015.
11. Sorrells, S.F.; Paredes, M.F.; Cebrian-Silla, A.; Sandoval, K.; Qi, D.; Kelley, K.W.; James, D.; Mayer, S.; Chang, J.; Augustine, K.I.; et al. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature* **2018**, *555*, 377–381, doi:10.1038/nature25975.
12. Cutler, R.R.; Kokovay, E. Rejuvenating subventricular zone neurogenesis in the aging brain. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2020**, *50*, 1–8, doi:10.1016/j.coph.2019.10.005.
13. Hsieh, J. Orchestrating transcriptional control of adult neurogenesis. *Genes Dev.* **2012**, *26*, 1010–1021, doi:10.1101/gad.187336.112.
14. Ding, W.Y.; Huang, J.; Wang, H. Waking up quiescent neural stem cells: Molecular mechanisms and implications in neurodevelopmental disorders. *PLoS Genet.* **2020**, *16*, 1–26, doi:10.1371/journal.pgen.1008653.
15. Liang, Z.; Jin, N.; Guo, W. Neural stem cell heterogeneity in adult hippocampus. *Cell Regen.* **2025**, *14*, 1–17, doi:10.1186/s13619-025-00222-4.

16. Alvarez-Buylla, A.; García-Verdugo, J.M.; Tramontin, A.D. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, *2*, 287–293, doi:10.1038/35067582.
17. Wang, F. wu; Hao, H. bo; Zhao, S. dou; Zhang, Y. min; Liu, Q.; Liu, H. juan; Liu, S. ming; Yuan, Q. huan; Bing, L. jun; Ling, E.A.; et al. Roles of activated astrocyte in neural stem cell proliferation and differentiation. *Stem Cell Res.* **2011**, *7*, 41–53, doi:10.1016/j.scr.2011.03.004.
18. Sagaradze, G.D.; Basalova, N.A.; Efimenko, A.Y.; Tkachuk, V.A. Mesenchymal Stromal Cells as Critical Contributors to Tissue Regeneration. *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 1–13, doi:10.3389/fcell.2020.576176.
19. Bast, L.; Calzolari, F.; Strasser, M.K.; Hasenauer, J.; Theis, F.J.; Ninkovic, J.; Marr, C. Increasing Neural Stem Cell Division Asymmetry and Quiescence Are Predicted to Contribute to the Age-Related Decline in Neurogenesis. *Cell Rep.* **2018**, *25*, 3231–3240.e8, doi:10.1016/j.celrep.2018.11.088.
20. Harris, L.; Rigo, P.; Stiehl, T.; Gaber, Z.B.; Austin, S.H.L.; Masdeu, M. del M.; Edwards, A.; Urbán, N.; Marciniak-Czochra, A.; Guillemot, F. Coordinated changes in cellular behavior ensure the lifelong maintenance of the hippocampal stem cell population. *Cell Stem Cell* **2021**, *28*, 863–876.e6, doi:10.1016/j.stem.2021.01.003.
21. Jean-Claude, P.; Bordey, A. The multifaceted subventricular zone astrocyte: from a metabolic and pro-neurogenic role to acting as a neural stem cell. *Neuroscience* **2016**, *26*, 20–28, doi:doi:10.1016/j.neuroscience.2015.10.053.
22. Paolicelli, R.C.; Sierra, A.; Stevens, B.; Tremblay, M.E.; Aguzzi, A.; Ajami, B.; Amit, I.; Audinat, E.; Bechmann, I.; Bennett, M.; et al. Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron* **2022**, *110*, 3458–3483, doi:10.1016/j.neuron.2022.10.020.
23. Wang, C.; Yue, H.; Hu, Z.; Shen, Y.; Ma, J.; Li, J.; Wang, X.-D.; Wang, L.; Sun, B.; Shi, P.; et al. Microglia mediate forgetting via complement-dependent synaptic elimination. *Science* **2020**, *367*, 688–694, doi:10.1126/science.aaz2288.
24. Cornell, J.; Salinas, S.; Huang, H.-Y.; Zhou, M. Microglia regulation of synaptic plasticity and learning and memory. *Neural Regen. Res.* **2022**, *17*, 705–716, doi:10.4103/1673-5374.322423.
25. Matsudaira, T.; Nakano, S.; Konishi, Y.; Kawamoto, S.; Uemura, K.; Kondo, T.; Sakurai, K.; Ozawa, T.; Hikida, T.; Komine, O.; et al. Cellular senescence in white matter microglia is induced during ageing in mice and exacerbates the neuroinflammatory phenotype. *Commun. Biol.* **2023**, *6*, 665, doi:10.1038/s42003-023-05027-2.
26. Quaresima, S.; Istiaq, A.; Jono, H.; Cacci, E.; Ohta, K.; Lupo, G. Assessing the Role of Ependymal and Vascular Cells as Sources of Extracellular Cues Regulating the Mouse Ventricular-Subventricular Zone Neurogenic Niche. *Front. Cell Dev. Biol.* **2022**, *10*, 1–15, doi:10.3389/fcell.2022.845567.
27. Deng, S.; Gan, L.; Liu, C.; Xu, T.; Zhou, S.; Guo, Y.; Zhang, Z.; Yang, G.Y.; Tian, H.; Tang, Y. Roles of Ependymal Cells in the Physiology and Pathology of the Central Nervous System. *Aging Dis.* **2023**, *14*, 468–483, doi:10.14336/AD.2022.0826-1.
28. Gaceb, A.; Barbariga, M.; Özen, I.; Paul, G. The pericyte secretome: Potential impact on regeneration. *Biochimie* **2018**, *155*, 16–25, doi:10.1016/j.biochi.2018.04.015.
29. Paredes, I.; Himmels, P.; Ruiz de Almodóvar, C. Neurovascular Communication during CNS

Development. *Dev. Cell* **2018**, *45*, 10–32, doi:10.1016/j.devcel.2018.01.023.

30. Gutierrez, B.; Liu, T.C.; Rodriguez, C.; Pastor-alonso, O.; Lambing, H.; Paredes, M.F.; Flanagan, L.A. Human endothelial cells promote a human neural stem cell type B phenotype via Notch signaling. *Nat. Commun.* **2025**, doi:10.1038/s41467-025-60194-6.
31. Reymond, S.; Vujić, T.; Sanchez, J.C. Neurovascular Unit-Derived Extracellular Vesicles: From Their Physiopathological Roles to Their Clinical Applications in Acute Brain Injuries. *Biomedicines* **2022**, *10*, doi:10.3390/biomedicines10092147.
32. Haragopal, H.; Yu, D.; Zeng, X.; Kim, S.-W.; Han, I.-B.; Ropper, A.E.; Anderson, J.E.; Teng, Y.D. Stemness enhancement of human neural stem cells following bone marrow MSC coculture. *Cell Transplant.* **2015**, *24*, 645–59, doi:10.3727/096368915X687561.
33. Mira, H.; Andreu, Z.; Suh, H.; Chichung Lie, D.; Jessberger, S.; Consiglio, A.; Emeterio, J.S.; Hortigüela, R.; Marqués-Torrejón, M.Á.; Nakashima, K.; et al. Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* **2010**, *7*, 78–89, doi:10.1016/j.stem.2010.04.016.
34. Austin, S.H.L.; Gabarró-Solanas, R.; Rigo, P.; Paun, O.; Harris, L.; Guillemot, F.; Urbán, N. Wnt/ β -catenin signalling is dispensable for adult neural stem cell homeostasis and activation. *Development* **2021**, *148*, 1–16, doi:10.1242/dev.199629.
35. Covacu, R.; Brundin, L. Effects of Neuroinflammation on Neural Stem Cells. *Neuroscientist* **2017**, *23*, 27–39, doi:10.1177/1073858415616559.
36. Cebrian-Silla, A.; Nascimento, M.A.; Redmond, S.A.; Mansky, B.; Wu, D.; Obernier, K.; Rodriguez, R.R.; Gonzalez-Granero, S.; Garcia-Verdugo, J.M.; Lim, D.A.; et al. Single-cell analysis of the ventricular-subventricular zone reveals signatures of dorsal and ventral adult neurogenic lineages. *Elife* **2021**, *10*, 1–34, doi:10.7554/eLife.67436.
37. Jinnou, H. Regeneration using endogenous neural stem cells following neonatal brain injury. *Pediatr. Int.* **2021**, *63*, 13–21, doi:10.1111/ped.14368.
38. Datta, A.; Sarmah, D.; Mounica, L.; Kaur, H.; Kesharwani, R.; Verma, G.; Veeresh, P.; Kotian, V.; Kalia, K.; Borah, A.; et al. Cell Death Pathways in Ischemic Stroke and Targeted Pharmacotherapy. *Transl. Stroke Res.* **2020**, *11*, 1185–1202, doi:10.1007/s12975-020-00806-z.
39. Xing, C.; Arai, K.; Lo, E.H.; Hommel, M. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int. J. Stroke* **2012**, *7*, 378–385, doi:10.1111/j.1747-4949.2012.00839.x.
40. Salaudeen, M.A.; Bello, N.; Danraka, R.N.; Ammani, M.L. Understanding the Pathophysiology of Ischemic Stroke: The Basis of Current Therapies and Opportunity for New Ones. *Biomolecules* **2024**, *14*, 1–23, doi:10.3390/biom14030305.
41. Stamatovic, S.M.; Phillips, C.M.; Martinez-Revollar, G.; Keep, R.F.; Andjelkovic, A. V. Involvement of epigenetic mechanisms and non-coding RNAs in blood-brain barrier and neurovascular unit injury and recovery after stroke. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 1–15, doi:10.3389/fnins.2019.00864.
42. Ward, N.S. Restoring brain function after stroke — bridging the gap between animals and humans. *Nat. Rev. Neurol.* **2017**, *13*, 244–255, doi:10.1038/nrneurol.2017.34.
43. Nath, S.; Martínez Santamaría, J.C.; Chu, Y.H.; Choi, J.S.; Conforti, P.; Lin, J. Di; Sankowski,

- R.; Amann, L.; Galanis, C.; Wu, K.; et al. Interaction between subventricular zone microglia and neural stem cells impacts the neurogenic response in a mouse model of cortical ischemic stroke. *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 1–13, doi:10.1038/s41467-024-53217-1.
44. Huang, S.; Ren, C.; Luo, Y.; Ding, Y.; Ji, X.; Li, S. New insights into the roles of oligodendrocytes regulation in ischemic stroke recovery. *Neurobiol. Dis.* **2023**, *184*, 106200, doi:10.1016/j.nbd.2023.106200.
 45. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.C.; Krause, D.S.; Deans, R.J.; Keating, A.; Prockop, D.J.; Horwitz, E.M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315–317, doi:10.1080/14653240600855905.
 46. Viswanathan, S.; Shi, Y.; Galipeau, J.; Krampera, M.; Leblanc, K.; Martin, I.; Nolta, J.; Phinney, D.G.; Sensebe, L. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy* **2019**, *21*, 1019–1024, doi:10.1016/j.jcyt.2019.08.002.
 47. Smolinska, A.; Bzinkowska, A.; Rybkowska, P.; Chodkowska, M.; Sarnowska, A. Promising Markers in the Context of Mesenchymal Stem / Stromal Cells Subpopulations with Unique Properties. *Stem Cells Int.* **2023**, *2023*, doi:https://doi.org/10.1155/2023/1842958.
 48. Luchetti, F.; Carloni, S.; Nasoni, M.G.; Reiter, R.J.; Balduini, W. Tunneling nanotubes and mesenchymal stem cells: New insights into the role of melatonin in neuronal recovery. *J. Pineal Res.* **2022**, *73*, 1–12, doi:10.1111/jpi.12800.
 49. Lotfy, A.; AboQuella, N.M.; Wang, H. Mesenchymal stromal/stem cell (MSC)-derived exosomes in clinical trials. *Stem Cell Res. Ther.* **2023**, *14*, 1–18, doi:10.1186/s13287-023-03287-7.
 50. Ferguson, S.W.; Wang, J.; Lee, C.J.; Liu, M.; Neelamegham, S.; Canty, J.M.; Nguyen, J. The microRNA regulatory landscape of MSC-derived exosomes: A systems view. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–12, doi:10.1038/s41598-018-19581-x.
 51. Ma, S.; Xie, N.; Li, W.; Yuan, B.; Shi, Y.; Wang, Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. **2014**, 216–225, doi:10.1038/cdd.2013.158.
 52. Prockop, D.J.; Youn Oh, J. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): Role as guardians of inflammation. *Mol. Ther.* **2012**, *20*, 14–20, doi:10.1038/mt.2011.211.
 53. Saldaña, L.; Bensiamar, F.; Vallés, G.; Mancebo, F.J.; García-rey, E.; Vilaboa, N. Immunoregulatory potential of mesenchymal stem cells following activation by macrophage-derived soluble factors. *Stem Cell Res. Ther.* **2019**, *6*, 1–15.
 54. Müller, L.; Tunger, A.; Wobus, M.; von Bonin, M.; Towers, R.; Bornhäuser, M.; Dazzi, F.; Wehner, R.; Schmitz, M. Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells: An Update. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, 1–9, doi:10.3389/fcell.2021.637725.
 55. Michelo, C.M.; Fasse, E.; van Cranenbroek, B.; Linda, K.; van der Meer, A.; Abdelrazik, H.; Joosten, I. Added effects of dexamethasone and mesenchymal stem cells on early Natural Killer cell activation. *Transpl. Immunol.* **2016**, *37*, 1–9, doi:10.1016/j.trim.2016.04.008.
 56. Gao, F.; Chiu, S.M.; Motan, D.A.L.; Zhang, Z.; Chen, L.; Ji, H.L.; Tse, H.F.; Fu, Q.L.; Lian, Q. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: Current status and future prospects. *Cell Death*

Dis. **2016**, 7, doi:10.1038/cddis.2015.327.

57. Greenhalgh, A.D.; David, S.; Bennett, F.C. Immune cell regulation of glia during CNS injury and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **2020**, 21, 139–152, doi:10.1038/s41583-020-0263-9.
58. Čamernik, K.; Marc, J.; Zupan, J. Human Skeletal Muscle-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cell Isolation and Growth Kinetics Analysis. *Methods Mol Biol* **2019**, 2045, 119–129, doi:10.1007/7651_2018_201.
59. Petrenko, Y.; Vackova, I.; Kekulova, K.; Chudickova, M.; Koci, Z.; Turnovcova, K.; Skalníková, H.K.; Vodicka, P.; Sarka, K. Comparative Analysis of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells derived from Different Sources , with a Focus on Neuroregenerative Potential. *Sci. Reports Nat.* **2020**, 1–15, doi:10.1038/s41598-020-61167-z.
60. Koutsoumparis, A.E.; Patsiarika, A.; Tsingotjidou, A.; Pappas, I.; Tsiftoglou, A.S. Neural Differentiation of Human Dental Mesenchymal Stem Cells Induced by ATRA and UDP-4: A Comparative Study. *Biomolecules* **2022**, 12, doi:10.3390/biom12020218.
61. Subramanian, A.; Fong, C.Y.; Biswas, A.; Bongso, A. Comparative characterization of cells from the various compartments of the human umbilical cord shows that the Wharton’s jelly compartment provides the best source of clinically utilizable mesenchymal stem cells. *PLoS One* **2015**, 10, 1–25, doi:10.1371/journal.pone.0127992.
62. Dabrowska, S.; Sypecka, J.; Jablonska, A.; Strojek, L.; Wielgos, M.; Domanska-Janik, K.; Sarnowska, A. Neuroprotective Potential and Paracrine Activity of Stromal Vs. Culture-Expanded hMSC Derived from Wharton Jelly under Co-Cultured with Hippocampal Organotypic Slices. *Mol. Neurobiol.* **2018**, 55, 6021–6036, doi:10.1007/s12035-017-0802-1.
63. Li, F.; Zhang, K.; Liu, H.; Yang, T.; Xiao, D.J.; Wang, Y.S. The neuroprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated through inhibition of apoptosis in hypoxic ischemic injury. *World J. Pediatr.* **2020**, 16, 193–200, doi:10.1007/s12519-019-00310-x.
64. Shin, Y.H.; Choi, S.J.; Kim, J.K. Mechanisms of Wharton’s Jelly-derived MSCs in enhancing peripheral nerve regeneration. *Sci. Rep.* **2023**, 13, doi:10.1038/s41598-023-48495-6.
65. 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, doi:10.3390/cells10040717.
66. Kang, Y.; Na, J.; Gul Karima, •; Amirthalingam, • Sivashanmugam; Hwang, N.S.; Kim, H.D. Mesenchymal Stem Cell Spheroids: A Promising Tool for Vascularized Tissue Regeneration. *Tissue Eng. Regen. Med.* **2024**, 21, 673–693, doi:10.1007/s13770-024-00636-2.
67. Lech, W.; Kot, M.; Welniak-Kaminska, M.; Drabik, M.; Buzanska, L.; Zychowicz, M. Dynamic changes in BDNF, VEGF, and GDNF after transplanting human protein-based scaffolds with Wharton’s Jelly MSCs in a rat brain injury model. *Sci. Rep.* **2025**, 15, 1–18, doi:10.1038/s41598-025-04269-w.
68. Ge, J.; Guo, L.; Wang, S.; Zhang, Y.; Cai, T.; Zhao, R.C.; Wu, Y. The size of mesenchymal stem cells is a significant cause of vascular obstructions and stroke. *Stem Cell Rev Rep* **2014**, 10, 295–303, doi:10.1007/s12015-013-9492-x.
69. Sierra-Parraga, J.M.; Merino, A.; Eijken, M.; Leuvenink, H.; Ploeg, R.; Møller, B.K.; Jespersen,

- B.; Baan, C.C.; Hoogduijn, M.J. Reparative effect of mesenchymal stromal cells on endothelial cells after hypoxic and inflammatory injury. *Stem Cell Res. Ther.* **2020**, *11*, 1–12, doi:10.1186/s13287-020-01869-3.
70. Velikic, G.; Maric, D.M.; Maric, D.L.; Supic, G.; Puletic, M.; Dulic, O.; Vojvodic, D. Harnessing the Stem Cell Niche in Regenerative Medicine: Innovative Avenue to Combat Neurodegenerative Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, doi:10.3390/ijms25020993.
 71. Yazdani, N.; Willits, R.K. Mimicking the neural stem cell niche: An engineer's view of cell: material interactions. *Front. Chem. Eng.* **2022**, *4*, 1–21, doi:10.3389/fceng.2022.1086099.
 72. Nemirovich-Danchenko, N.M.; Khodanovich, M.Y. New Neurons in the Post-ischemic and Injured Brain: Migrating or Resident? *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, doi:10.3389/FNINS.2019.00588.
 73. Moon, S.; Chang, M.S.; Koh, S.H.; Choi, Y.K. Repair mechanisms of the neurovascular unit after ischemic stroke with a focus on vegf. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22168543.
 74. Wu, N.; Sun, X.; Zhou, C.; Yan, J.; Cheng, C. Neuroblasts migration under control of reactive astrocyte - derived BDNF : a promising therapy in late neurogenesis after traumatic brain injury. **2023**, 1–14, doi:10.1186/s13287-022-03232-0.
 75. Ceanga, M.; Dahab, M.; Witte, O.W.; Keiner, S. Adult Neurogenesis and Stroke: A Tale of Two Neurogenic Niches. *Front. Neurosci.* **2021**, *15*, 700297, doi:10.3389/fnins.2021.700297.
 76. Ottoboni, L.; Merlini, A.; Martino, G. Neural stem cell plasticity: Advantages in therapy for the injured central nervous system. *Front. Cell Dev. Biol.* **2017**, *5*, doi:10.3389/fcell.2017.00052.
 77. Llorente, V.; Velarde, P.; Desco, M.; Gómez-Gaviro, M.V. Current Understanding of the Neural Stem Cell Niches. *Cells* **2022**, *11*, doi:10.3390/cells11193002.
 78. 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*, doi:10.3390/jcm10091813.
 79. Lech, W.; Figiel-Dabrowska, A.; Sarnowska, A.; Drela, K.; Obtulowicz, P.; Noszczyk, B.H.; Buzanska, L.; Domanska-Janik, K. Phenotypic, Functional, and Safety Control at Preimplantation Phase of MSC-Based Therapy. *Stem Cells Int.* **2016**, *2016*, doi:10.1155/2016/2514917.
 80. Alvites, R.; Branquinho, M.; Sousa, A.C.; Lopes, B.; Sousa, P.; Maurício, A.C. Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Their Paracrine Activity—Immunomodulation Mechanisms and How to Influence the Therapeutic Potential. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, doi:10.3390/pharmaceutics14020381.
 81. Ciavarella, C.; Valente, S.; Pasquinelli, G. The Characteristics and Survival Potential Under Sub-lethal Stress of Mesenchymal Stromal/Stem Cells Isolated from the Human Vascular Wall. *Stem Cells* **2022**, *40*, 1071–1077, doi:10.1093/stmcls/sxac066.
 82. Edmondson, R.; Broglie, J.J.; Adcock, A.F.; Yang, L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev Techn* **2014**, *12*, 207–218, doi:10.1089/adt.2014.573.

83. Rybkowska, P.; Radoszkiewicz, K.; Kawalec, M.; Dymkowska, D.; Zabłocka, B.; Zabłocki, K.; Sarnowska, A. The Metabolic Changes between Monolayer (2D) and Three-Dimensional (3D) Culture Conditions in Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Adipose Tissue. *Cells* **2023**, *12*, 178.
84. Korff, T.; Augustin, H.G. Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. *J. Cell Biol.* **1998**, *143*, 1341–1352, doi:10.1083/jcb.143.5.1341.
85. Koike, N.; Fukumura, D.; Gralla, O.; Au, P.; Schechner, J.S.; Jain, R.K. Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels. *Nature* **2004**, *428*, 138–139, doi:10.1038/428138a.
86. Sano, T.; Nakajima, T.; Senda, K.A.; Nakano, S.; Yamato, M.; Ikeda, Y.; Zeng, H.; Kawabe, J. ichi; Matsunaga, Y.T. Image-based crosstalk analysis of cell–cell interactions during sprouting angiogenesis using blood-vessel-on-a-chip. *Stem Cell Res. Ther.* **2022**, *13*, 1–17, doi:10.1186/s13287-022-03223-1.
87. Kim, S.; Lee, S.; Lim, J.; Choi, H.; Kang, H.; Jeon, N.L.; Son, Y. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells play a role as a vascular pericyte in the reconstruction of human BBB on the angiogenesis microfluidic chip. *Biomaterials* **2021**, *279*, 121210, doi:https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.121210.
88. Melincovici, C.S.; Boşca, A.B.; Şuşman, S.; Mărginean, M.; Mişu, C.; Istrate, M.; Moldovan, I.M.; Roman, A.L.; Mişu, C.M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom. J. Morphol. Embryol.* **2018**, *59*, 455–467.
89. Zhang, Z.G.; Zhang, L.; Jiang, Q.; Zhang, R.; Davies, K.; Powers, C.; Van Bruggen, N.; Chopp, M. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J. Clin. Invest.* **2000**, *106*, 829–838, doi:10.1172/JCI9369.
90. Weddell, J.C.; Chen, S.; Imoukhuede, P.I. VEGFR1 promotes cell migration and proliferation through PLC γ and PI3K pathways. *npj Syst. Biol. Appl.* **2018**, *4*, 1–11, doi:10.1038/s41540-017-0037-9.
91. Joshkon, A.; Heim, X.; Dubrou, C.; Bachelier, R.; Traboulsi, W.; Stalin, J.; Fayyad-Kazan, H.; Badran, B.; Foucault-Bertaud, A.; Leroyer, A.S.; et al. Role of CD146 (MCAM) in physiological and pathological angiogenesis—contribution of new antibodies for therapy. *Biomedicines* **2020**, *8*, 1–19, doi:10.3390/biomedicines8120633.
92. Radoszkiewicz, K.; Jezierska-Woźniak, K.; Waśniewski, T.; Sarnowska, A. Understanding Intra- and Inter-Species Variability in Neural Stem Cells' Biology Is Key to Their Successful Cryopreservation, Culture, and Propagation. *Cells* **2023**, *12*, doi:10.3390/cells12030488.
93. Galli, R.; Gritti, A.; Bonfanti, L.; Vescovi, A.L. Neural stem cells. *Circ. Res.* **2003**, *598*–608, doi:10.1161/01.res.0000065580.02404.f4.
94. Morante-Redolat, J.M.; Porlan, E. Neural stem cell regulation by adhesion molecules within the subependymal niche. *Front. Cell Dev. Biol.* **2019**, *7*, 1–8, doi:10.3389/fcell.2019.00102.
95. Hall, P.E.; Lathia, J.D.; Caldwell, M.A.; French-Constant, C. Laminin enhances the growth of human neural stem cells in defined culture media. *BMC Neurosci.* **2008**, *9*, 1–10, doi:10.1186/1471-2202-9-71.
96. Li, Q. ming; Fu, Y. ming; Shan, Z. yan; Shen, J. ling; Zhang, X. mei; Lei, L.; Jin, L. hong MSCs

- guide neurite directional extension and promote oligodendrogenesis in NSCs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, doi:10.1016/j.bbrc.2009.04.147.
97. Shi, W.; Nie, D.; Jin, G.; Chen, W.; Xia, L.; Wu, X.; Su, X.; Xu, X.; Ni, L.; Zhang, X.; et al. BDNF blended chitosan scaffolds for human umbilical cord MSC transplants in traumatic brain injury therapy. *Biomaterials* **2012**, *33*, 3119–3126, doi:10.1016/j.biomaterials.2012.01.009.
 98. Yousefi, F.; Lavi Arab, F.; Saeidi, K.; Amiri, H.; Mahmoudi, M. Various strategies to improve efficacy of stem cell transplantation in multiple sclerosis: Focus on mesenchymal stem cells and neuroprotection. *J. Neuroimmunol.* **2019**, *328*, 20–34, doi:10.1016/j.jneuroim.2018.11.015.
 99. David-Bercholz, J.; Kuo, C.T.; Deneen, B. Astrocyte and Oligodendrocyte Responses From the Subventricular Zone After Injury. *Front. Cell. Neurosci.* **2021**, *15*, 1–14, doi:10.3389/fncel.2021.797553.
 100. Wislet-Gendebien, S.; Bruyère, F.; Hans, G.; Leprince, P.; Moonen, G.; Rogister, B. Nestin-positive mesenchymal stem cells favour the astroglial lineage in neural progenitors and stem cells by releasing active BMP4. *BMC Neurosci.* **2004**, *5*, 1–12, doi:10.1186/1471-2202-5-33.
 101. Fang, H.; Song, P.; Shen, Y.; Shen, C.; Liu, X. Bone mesenchymal stem cell-conditioned medium decreases the generation of astrocytes during the process of neural stem cells differentiation. *J. Spinal Cord Med.* **2018**, *41*, 10–16, doi:10.1080/10790268.2017.1314880.
 102. Cao, L.; Shangguan, Z.; Zhang, Y.; Luo, Z.; Chen, C.; Yan, H.; Fu, X.; Tan, W.; Wang, C.; Dou, X.; et al. Vegfr3 activation of Pkd2l1+ CSF-cNs triggers the neural stem cell response in spinal cord injury. *Cell. Signal.* **2025**, *130*, 111675, doi:10.1016/j.cellsig.2025.111675.
 103. Kaminska, A.; Radoszkiewicz, K.; Rybkowska, P.; Wedzinska, A.; Sarnowska, A. Interaction of Neural Stem Cells (NSCs) and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) as a Promising Approach in Brain Study and Nerve Regeneration. *Cells* **2022**, *11*, doi:10.3390/cells11091464.
 104. Stoppini, L.; Buchs, P.A.; Muller, D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods* **1991**, *37*, 173–182, doi:10.1016/0165-0270(91)90128-M.
 105. De Simoni, A.; MY Yu, L. Preparation of organotypic hippocampal slice cultures: interface method. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1439–1445, doi:10.1038/nprot.2006.228.
 106. Teixeira, F.G.; Panchalingam, K.M.; Assunção-Silva, R.; Serra, S.C.; Mendes-Pinheiro, B.; Patrício, P.; Jung, S.; Anjo, S.I.; Manadas, B.; Pinto, L.; et al. Modulation of the Mesenchymal Stem Cell Secretome Using Computer-Controlled Bioreactors: Impact on Neuronal Cell Proliferation, Survival and Differentiation. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–14, doi:10.1038/srep27791.
 107. Zimna, A.; Kurpisz, M. Hypoxia-Inducible factor-1 in physiological and pathophysiological angiogenesis: Applications and therapies. *Biomed Res. Int.* **2015**, *2015*, doi:10.1155/2015/549412.

108. Wu, M.; Chen, L.; Qi, Y.; Ci, H.; Mou, S.; Yang, J.; Yuan, Q.; Yao, W.; Wang, Z.; Sun, J. Human umbilical cord mesenchymal stem cell promotes angiogenesis via integrin $\beta 1$ /ERK1/2/HIF-1 α /VEGF-A signaling pathway for off-the-shelf breast tissue engineering 2022, 13:99.
109. Jain, D.; Mattiassi, S.; Goh, E.; Yim, E. Extracellular matrix and biomimetic engineering microenvironment for neuronal differentiation. *Neural Regen. Res.* **2020**, *15*, 573–585, doi:10.4103/1673-5374.266907.
110. Kaminska, A.; Wedzinska, A.; Kot, M.; Sarnowska, A. Effect of Long-Term 3D Spheroid Culture on WJ-MSC. *Cells* **2021**, *10*, 719, doi:10.3390/cells10040719.
111. Cesarz, Z.; Tamama, K. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* **2016**, *2016*, doi:10.1155/2016/9176357.
112. Gangadaran, P.; Oh, E.J.; Rajendran, R.L.; Oh, J.M.; Kim, H.M.; Kwak, S.; Chung, H.Y.; Lee, J.; Ahn, B.-C.; Hong, C.M. Three-dimensional culture conditioned bone marrow MSC secretome accelerates wound healing in a burn injury mouse model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2023**, *673*, 87–95, doi:10.1016/j.bbrc.2023.05.088.
113. Jalilian, E.; Massoumi, H.; Bigit, B.; Amin, S.; Katz, E.A.; Guaiquil, V.H.; Anwar, K.N.; Hematti, P.; Rosenblatt, M.I.; Djalilian, A.R. Bone marrow mesenchymal stromal cells in a 3D system produce higher concentration of extracellular vesicles (EVs) with increased complexity and enhanced neuronal growth properties. *Stem Cell Res. Ther.* **2022**, *13*, 1–13, doi:10.1186/s13287-022-03128-z.
114. Kusuma, G.D.; Li, A.; Zhu, D.; McDonald, H.; Inocencio, I.M.; Chambers, D.C.; Sinclair, K.; Fang, H.; Greening, D.W.; Frith, J.E.; et al. Effect of 2D and 3D Culture Microenvironments on Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Potencies. *Front. cell Dev. Biol.* **2022**, *10*, 819726, doi:10.3389/fcell.2022.819726.
115. Pischitta, F.; Cavaleiro, H.; Caruso, E.; Tribuzio, F.; Di Marzo, N.; Moro, F.; Kobeissy, F.; Wang, K.K.; Salgado, A.J.; Zanier, E.R. A novel organotypic cortical slice culture model for traumatic brain injury: molecular changes induced by injury and mesenchymal stromal cell secretome treatment. *Front. Cell. Neurosci.* **2023**, *17*, 1–12, doi:10.3389/fncel.2023.1217987.
116. Rivera, F.J.; Siebzehntrubl, F.A.; Kandasamy, M.; Couillard-Despres, S.; Caioni, M.; Poehler, A.-M.; Berninger, B.; Sandner, B.; Bogdahn, U.; Goetz, M.; et al. Mesenchymal stem cells promote oligodendroglial differentiation in hippocampal slice cultures. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2009**, *24*, 317–324, doi:10.1159/000233256.
117. Park, H.; Poo, M. Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat. Rev. Neurosci.* **2013**, *14*, 7–23, doi:10.1038/nrn3379.

118. Bathina, S.; Das, U.N. Brain-derived neurotrophic factor and its clinical implications. *Arch. Med. Sci.* **2015**, *11*, 1164–1178, doi:10.5114/aoms.2015.56342.
119. Deng, J.; Petersen, B.E.; Steindler, D.A.; Jorgensen, M.L.; Laywell, E.D. Mesenchymal Stem Cells Spontaneously Express Neural Proteins in Culture and Are Neurogenic after Transplantation. *Stem Cells* **2006**, *24*, 1054–1064, doi:10.1634/stemcells.2005-0370.
120. Kugler, E.C.; Greenwood, J.; MacDonald, R.B. The “Neuro-Glial-Vascular” Unit: The Role of Glia in Neurovascular Unit Formation and Dysfunction. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *9*, doi:10.3389/fcell.2021.732820.
121. Gullotta, G.S.; Costantino, G.; Sortino, M.A.; Spampinato, S.F. Microglia and the Blood – Brain Barrier : An External Player in Acute and Chronic Neuroinflammatory Conditions. **2023**.