

mgr Anna Andrzejewska

Aktywność biologiczna ludzkich mezenchymalnych komórek
macierzystych z nad-ekspresją receptora VLA-4;
badania funkcjonalne *in vitro* i *in vivo*

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych
w dyscyplinie: biologii medycznej

Promotor: Prof. dr hab. Barbara Łukomska

Promotor pomocniczy: Dr hab. Mirosław Janowski



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

Warszawa 2018

Wyniki zamieszczone w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały opublikowane bądź są aktualnie przedmiotem recenzji w czasopiśmie, do którego zostały przesłane w postaci manuskryptów prac oryginalnych:

1. **Andrzejewska A**, Nowakowski A, Janowski M, Bulte j, Gilad A, Walczak P, Lukomska B: Pre- and post mortem imaging of transplanted cells. *Int J Nanomed* 2015;10:5543-5559
IF_{5letni} =5.034
2. Nowakowski A, **Andrzejewska A**, Boltze J, Nitzsche F, Cui L, Jolkkonen J, Walczak P, Lukomska B, Janowski M: Translation, but not transfection limits clinically relevant, exogenous mRNA based induction of alpha-4 integrin expression on human mesenchymal stem cells. *Scientific Reports* 2017 Apr 24;7(1):1103
IF_{5letni} =4.609
3. **Andrzejewska A**, Nowakowski A, Grygorowicz T, Dąbrowska S, Orzel J, Walczak P, Lukomska B, Janowski M: Single-cell, high-throughput analysis of cell docking to vessel wall. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism (w druku)*
IF_{5letni} =6.030
4. **Andrzejewska A**, Nowakowski A, Dabrowska S, Janowski M, Walczak P, Lukomska B: Labeling of human mesenchymal stem cells with different classes of vital stains: robustness and toxicity. *Stem Cell Research and Therapy (przesłane do redakcji czasopisma, w recenzjach)*
IF_{5letni} =5.382
5. **Andrzejewska A**, Lukomska B, Janowski M: Mesenchymal stem cells: from roots to boost. *Stem Cells (przesłane do redakcji czasopisma, w recenzjach)*
IF_{5letni} = 6.174

Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej rozprawie doktorskiej były częściowo finansowane w ramach międzynarodowych projektów naukowo badawczych:

Projekt międzynarodowy ERA-NET NEURON pt. „MRI navigated enhancement of mesenchymal stem cells (MSC) homing toward stroke lesion –evaluating an impact on animal recovery with behavioral testing and imaging” (2012-2015) NCBiR (koordynator: Prof. Barbara Łukomska, kierownik zadania 2 - mgr Anna Andrzejewska)

Projekt międzynarodowy STRATEGMED I pt. “Exploitation of Regenerative Potential of Mesenchymal Stem Cells” (2016-2020), NCBiR (koordynator: dr hab. Mirosław Janowski, kierownik zadania 3 - mgr Anna Andrzejewska)

Pragnę złożyć wyrazy wdzięczności mojemu opiekunowi naukowemu

Pani Profesor Dr hab. Barbarze Łukomskiej

*za merytoryczne ukierunkowanie niniejszej rozprawy doktorskiej
oraz wsparcie, cierpliwość, życzliwość i wiarę we mnie,
którymi byłam otoczona w trakcie jej realizacji.*

Składam serdeczne podziękowania:

Dr hab. Mirosławowi Janowskiemu

*Za cenne rady, dyskusje i pomoc, na które zawsze mogłam liczyć
pomimo bariery odległości i różnicy czasu, a które w sposób znaczący
przyczyniły się do mojego rozwoju naukowego.*

*Chciałabym także podziękować
wszystkim prawcownikom i doktorantom Zakładu Neurobiologii Naprawczej
za przyjazną atmosferę, dzięki której z przyjemnością każdego dnia przychodziłam do pracy.*

*Szczególne podziękowania przekazuję Sylwii Dąbrowskiej,
z którą dzieliliśmy nasze największe zmagania
i sukcesy w czasie realizacji prac doktorskich.*

*„Nie wiem, jak wyglądam w oczach świata, lecz dla siebie jestem tylko chłopcem bawiącym
się na morskim brzegu, pochylającym się i znajdującym piękniejszą muszelkę lub kamień
gładszy niż inne, podczas gdy wielki ocean prawdy jest ciągle zakryty przede mną.”*

Isaac Newton

Spis treści

| | |
|--|-----------|
| STRESZCZENIE..... | 11 |
| ABSTRACT..... | 15 |
| INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ..... | 18 |
| 1. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA | 19 |
| 1.1. Mezenchymalne komórki macierzyste/komórki zrębu..... | 19 |
| 1.1.1. Historia odkrycia mezenchymalnych komórek macierzystych i ich nazewnictwo | 19 |
| 1.1.2. Źródła i techniki izolacji mezenchymalnych komórek macierzystych | 20 |
| 1.1.3. Heterogenność populacji mezenchymalnych komórek macierzystych..... | 20 |
| 1.1.4. Kryteria identyfikacji mezenchymalnych komórek macierzystych..... | 22 |
| 1.1.5. Pochodzenie mezenchymalnych komórek macierzystych | 22 |
| 1.1.6. Nisza mezenchymalnych komórek macierzystych w dorosłym organizmie | 23 |
| 1.1.7. Immunogenność MSCs | 24 |
| 1.1.8. Właściwości immunomodulacyjne mezenchymalnych komórek macierzystych | 24 |
| 1.1.9. Właściwości parakryne mezenchymalnych komórek macierzystych..... | 26 |
| 1.1.10. Zdolność mezenchymalnych komórek macierzystych do różnicowania..... | 28 |
| 1.2. Eksperymentalne próby wykorzystania mezenchymalnych komórek macierzystych w leczeniu chorób układu nerwowego..... | 29 |
| 1.2.1. Udar mózgu | 30 |
| 1.2.2. Choroba Alzheimera | 31 |
| 1.2.3. Stwardnienie zanikowe boczne | 32 |
| 1.2.4. Choroba Huntingtona | 32 |
| 1.2.5. Choroba Parkinsona | 32 |
| 1.2.6. Stwardnienie rozsiane | 33 |
| 1.2.7. Uszkodzenie rdzenia kręgowego | 33 |
| 1.3. Techniki wykorzystywane w celu wizualizacji przeszczepionych mezenchymalnych komórek macierzystych..... | 36 |
| 1.3.1. Znaczniki radioaktywne | 36 |
| 1.3.2. Środki kontrastowe stosowane do obrazowania w rezonansie magnetycznym | 37 |
| 1.3.3. Środki wykorzystywane w technice bioluminescencji..... | 38 |
| 1.3.4. Znaczniki fluorescencyjne | 40 |
| 1.3.5. Geny reporterowe | 40 |
| 1.4. Sposoby przeszczepiania komórek macierzystych stosowane w terapii uszkodzeń OUN | 42 |
| 1.5. Transfer komórek endo- i egzogennych z łożyska naczyniowego do struktur OUN | 44 |

| | |
|---|----|
| 1.5.1. Budowa i funkcje bariery krew-mózg | 45 |
| 1.5.2. Zmiany właściwości BBB na skutek udaru niedokrwienego mózgu | 46 |
| 1.5.3. Proces diapedezy leukocytów w stanach patologicznych OUN | 48 |
| 1.5.4. Migracja i ekstrawazacja mezenchymalnych komórek macierzystych po ich transplantacji do łożyska naczyniowego | 51 |
| 1.6. Techniki zwiększające zasiedlanie obszaru uszkodzenia przez mezenchymalne komórki macierzyste podane systemowo | 52 |
| 1.6.1. Zmiana warunków hodowli <i>in vitro</i> (ang. pre-treatment)..... | 53 |
| 1.6.2. Modyfikacje genetyczne komórek..... | 53 |
| 1.6.3. Inżynieria błony komórkowej..... | 56 |
| 1.6.4. Zmiana właściwości tkanki docelowej..... | 56 |
| 2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY | 58 |
| 3. MATERIAŁ..... | 60 |
| 3.1. Ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego | 60 |
| 3.2. Zwierzęta doświadczalne | 60 |
| 4. METODY BADAŃ..... | 61 |
| 4.1. Hodowla komórek hBM-MSCs | 61 |
| 4.2. Znakowanie komórek hBM-MSCs markerem CellTracker™ Green CMFDA..... | 61 |
| 4.3. Znakowanie komórek hBM-MSCs przy użyciu Molday ION | 61 |
| 4.4. Transfekcja komórek hBM-MSCs Stemgent® eGFP mRNA | 61 |
| 4.5. Ocena aktywności metabolicznej komórek hBM-MSCs..... | 62 |
| 4.6. Analiza immunocytochemiczna komórek hBM-MSCs..... | 62 |
| 4.7. Analiza ekspresji wybranych genów w komórkach hBM-MSCs | 63 |
| 4.8. Różnicowanie hBM-MSCs w kierunku adipocytów | 64 |
| 4.9. Różnicowanie komórek hBM-MSCs w kierunku osteoblastów..... | 65 |
| 4.10. Różnicowanie komórek hBM-MSCs w kierunku chondrocytów | 65 |
| 4.11. Transfekcja komórek hBM-MSCs mRNA ITGA4 | 65 |
| 4.12. Pomiar wielkości komórek | 66 |
| 4.13. Analiza populacji hBM-MSCs w cytometrze przepływowym | 66 |
| 4.14. Ocena ruchu komórek hBM-MSCs <i>in vitro</i> podczas ich przepływu przez kanał komory mikroprzepływowej (<i>microfluid assay</i>) | 67 |
| 4.15. Ocena migracji komórek w komorach migracyjnych typu <i>transwell</i> | 72 |
| 4.16. Model uszkodzenia mózgu ouabainą | 72 |
| 4.17. Dotętnicza transplantacja komórek hBM-MSCs | 73 |

| | |
|---|-----|
| 4.18. Obrazowanie mózgu szczura w MRI i analiza uzyskanych obrazów | 74 |
| 9. Pobieranie materiału do badań..... | 75 |
| 4.20. Analiza immunohistochemiczna skrawków mózgu szczura..... | 75 |
| 4.21. Wizualizacja obrazów w mikroskopie konfokalnym | 76 |
| 4.22. Analiza statystyczna | 76 |
| 5. WYNIKI BADAŃ..... | 77 |
| 5.1. Ocena właściwości biologicznych hBM-MSCs <i>in vitro</i> , po znakowaniu komórek wybranymi barwnikami przyżyciowymi..... | 77 |
| 5.1.1. Optymalizacja znakowania hBM-MSCs w celu ich obrazowania w warunkach <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> | 77 |
| 5.1.2. Ocena morfologii hBM-MSCs znakowanych wybranymi barwnikami | 79 |
| 5.1.3. Ocena fenotypu komórek hBM-MSCs znakowanych różnymi barwnikami | 81 |
| 5.1.4. Wpływ znakowania hBM-MSCs wybranymi barwnikami na aktywność metaboliczną komórek | 84 |
| 5.1.5. Analiza poziomu transkryptów kodujących wybrane czynniki wzrostu podlegające ekspresji w hBM-MSCs po wyznakowaniu komórek różnymi barwnikami przyżyciowymi | 85 |
| 5.1.6. Wpływ znakowania hBM-MSC różnymi barwnikami na różnicowanie w kierunku 3 typów komórek wywodzących się z mezodermy | 86 |
| 5.2. Analiza właściwości adhezyjnych hBM-MSC wykazujących nad-ekspresję integryny $\alpha 4$ | 92 |
| 5.2.1. Ocena profilu ekspresji białka $\alpha 4$ po transfekcji hBM-MSCs przy użyciu mRNA ITGA4..... | 92 |
| 5.2.2. Walidacja programu CellFlow Tracker | 93 |
| 5.2.3. Ocena kinetyki ruchu hBM-MSCs natywnych i komórek transfekowanych mRNA ITGA4 przy pomocy techniki mikroprzepływów | 95 |
| 5.2.4. Analiza zdolności migracyjnych natywnych oraz transfekowanych mRNA ITGA4 komórek hBM-MSCs <i>in vitro</i> w komorach migracyjnych typu transwell | 98 |
| 5.3. Ocena hBM-MSCs przeszczepianych dotętniczo u biorców z uszkodzeniem mózgu | 100 |
| 5.3.1. Analiza zasiedlania uszkodzonych obszarów mózgu przez systemowo podane hBM-MSCs | 100 |
| 5.3.2. Ocena lokalizacji i zdolności do transmigracji hBM-MSCs kontrolnych lub wykazujących nad-ekspresję integryny $\alpha 4$ obecnych po przeszczepie w uszkodzonym mózgu | 101 |
| 6. Dyskusja wyników | 107 |
| 6.1. Optymalizacja znakowania komórek barwnikami w celu ich obrazowania <i>in vitro</i> i <i>in vivo</i> | 108 |
| 6.2. Dobór optymalnej metody modyfikacji mezenchymalnych komórek macierzystych | 111 |
| 6.3. Właściwości adhezyjne komórek związane z ekspresją molekuł przylegania..... | 112 |
| 6.4. Ocena komórek przeszczepianych dotętniczo u biorców w modelach uszkodzenia mózgu | 114 |
| 7. PODSUMOWANIE..... | 119 |

| | |
|---------------------------|-----|
| 8. WNIOSKI | 119 |
| 9. SPIS PIŚMIENICTWA..... | 120 |

WYKAZ SKRÓTÓW

| | |
|---------------|---|
| AAV | wirusy związane z adenowirusami; ang. adeno-associated virus |
| AJ | połączenie przylegające; ang. adherence junction |
| ALP | fosfataza zasadowa; ang. alkaline phosphatase |
| Ang-1 | angiopoetyna-1; ang. angiopoietin-1 |
| APC | komórki prezentujące antygen; ang. antigen presenting cells |
| ApoE | apolipoproteina E; ang. apolipoprotein E |
| ARCA | analog czapeczki mRNA; ang. Anti-Reverse Cap Analog |
| Arf GAPs | białka aktywujące GTPazę z rodziny Arf; ang. ADP-ribosylation factor GTPase activating proteins |
| ASIA | skala uszkodzeń funkcjonalnych klasyfikacji urazów rdzenia kręgowego; ang. American Spinal Injury Association scale |
| ATP | adenozyno-5'-trifosforan; ang. adenosine triphosphate |
| BBB | bariera krew-mózg; ang. blood-brain barrier |
| BCSFB | bariera krew-płyn mózgowo rdzeniowy; ang. blood-cerebrospinal fluid barrier |
| BDNF | czynnik wzrostu pochodzenia mózgowego; ang. brain-derived neurotrophic factor |
| bFGF | zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów; ang. basic fibroblast growth factor |
| BFP | białko niebieskiej fluorescencji; ang. blue fluorescent protein |
| BLMB | bariera krew-opony mózgu; ang. blood-leptomeningeal barrier |
| BME | β -merkaptoetanol |
| BMP | białka morfogenetyczne kości; ang. bone morphogenetic proteins |
| cAMP | cykliczny adenozyjno-3',5'-monofosforan; ang. 3',5'-cyclic adenosine monophosphate |
| CCL | chemokina z motywem CC; ang. C-C motif chemokine ligand |
| CCL5 (RANTES) | białko chemotaktyczne syntetyzowane przez limfocyty T, powoduje aktywację, chemotaksję, adhezję limfocytów T oraz ich migrację; ang. regulation on activation normal T-cells expressed and secreted |
| CCL8 (MCP-2) | białko chemotaktyczne monocytów-2; ang. monocyte chemoattractant protein 2 |
| CCR | receptory wiążące chemokiny podrodziny C-C |
| CCR2 | receptor chemokin z motywem CC-2; ang. CC chemokine receptor-2 |
| CD | kompleks różnicowania; ang. cluster of differentiation |
| CFDA-SE; CFSE | znacznik fluorescencyjny komórek |
| CFU-F | jednostki tworzące kolonie fibroblastów; ang. colony forming unit-fibroblastoid |
| cGMP | cykliczny guanozyjno-3',5'-monofosforan; ang. cyclic guanosine monophosphate |
| CINC-3 | cytokina indukowana chemoatraktantem dla neutrofilii; ang. cytokine-induced neutrophil chemoattractant |
| CM-Dil | fluorescencyjny znacznik komórkowy |
| CMFDA | fluorescencyjny znacznik komórkowy; ang. 5-ChloroMethyl-Fluorescein-DiAcetate |
| CNTF | rzęskowy czynnik neurotroficzny; ang. Ciliary Neurotrophic Factor |
| CXCL | chemokiny CXC; ang. CXC chemokines |
| CXCL12/SDF-1a | czynnik podścieliska-1a; ang. stromal cell-derived factor 1a |
| CXCR4 | receptor dla chemokin z rodziny CXC 4; ang. CXC chemokine receptor type 4 |
| DAPI | 4',6-diamidyno-2'-fenyloindol dichlorowodorek |
| DLX5 | czynnik transkrypcyjny z motywem homeodomeny 5; ang. distal-less homeodomain protein 5 |

| | |
|----------------|---|
| DMEM | pożywka hodowlana; ang. Dulbecco/Vogt Modified Eagle's Minimal Essential Medium |
| DMSO | dimetylosulfotlenek; ang. Dimethyl sulfoxide |
| DNA | kwasy deoksyrybonukleinowe |
| DsRed | białko czerwonej fluorescencji; ang. red fluorescent protein |
| EAE | eksperymentalne zapalenie mózgu i rdzenia; ang. experimental autoimmune encephalomyelitis |
| ECM | macierz zewnątrzkomórkowa; ang. extracellular matrix |
| EGF | nabłonkowy czynnik wzrostu; ang. epidermal growth factor |
| eGFP | wzmocnione białko zielonej fluorescencji; ang. enhanced Green Fluorescent Protein |
| ENO2 | enolaza swoista dla neuronów; ang. enolase 2 |
| FAK | ogniskowa kinaza adhezji; ang. focal adhesion kinase |
| FGF-BP | białko wiążące bFGF; ang. FGF-Binding Protein |
| FL | fluorescencja; ang. fluorescence |
| flt3 | ligand kinazy tyrozynowej-3; ang. fms-related tyrosine kinase 3 ligand |
| Fluc | lucyferaza świetlika; ang. firefly luciferase |
| GABA | kwasy γ -aminomasłowe; ang. gamma-aminobutyric acid |
| GAPDH | dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego; ang. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase |
| GDNF | czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego; ang. glial cell line-derived neurotrophic factor |
| GFP | białko zielonej fluorescencji; ang. green fluorescent protein |
| GLUT-1 | transporter glukozy-1; ang. glucose transporter 1 |
| Gly-CAM1 | cząsteczka adhezji komórkowej zależna od glikozylacji; ang. glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1 |
| GRPs | prekursory komórek glejowych; ang. Glia Progenitor Cells |
| HEK293 | linia komórkowa ludzkich embrionalnych komórek nerki 293; ang. Human embryonic kidney cells 293 |
| <i>hERL</i> | ligand ludzkiego receptora dla estrogenu; ang. human estrogen receptor ligand |
| HGF | czynnik wzrostu hepatocytów; ang. hepatocyte growth factor |
| HIF1 α | czynnik indukowany niedotlenieniem 1 α ; ang. hypoxia-inducible factor 1 α |
| HLA I | antygeny ludzkich leukocytów klasy I; ang. human leukocyte antigens class I |
| HLA II | antygeny ludzkich leukocytów klasy II; ang. human leukocyte antigens class II |
| HNF-4 α | jądrowy czynnik hepatocytów 4 α ; ang. hepatocyte nuclear factor 4 α |
| HO-1 | hemooksygenaza-1; ang. heme oxygenase-1 |
| Hoechst | Fenol,4-[5-(4-metylo-1-piperazynyl)[2,5'-bi-1H-benzimidazol]-2'-yl]-,trihydrochlorek |
| HUCB-NSC | neuronalne komórki macierzyste izolowane z krwi pępowinowej; ang. Human Umbilical Cord Blood-derived Neural Stem Cell |
| Huh7 | linia komórkowa ludzkiego pierwotnego raka wątroby; ang. Human hepato cellular carcinoma cells |
| IANR-SCIFRS | ang. International Association of Neurorestoratology-Spinal Cord Injury Functional Rating Scale |
| ICAM | cząsteczka adhezji międzykomórkowej; ang. intercellular adhesion molecule |
| IDO | 2,3 dioksygenaza indoloaminy; ang. indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase |
| IFN- γ | interferon γ |
| Ig | immunoglobulina; ang. Immunoglobulin |
| IGF | insulinopodobny czynnik wzrostu ; ang. insulin-like growth factor |
| IGFBP-1 | białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu 1; ang. ang. IGF -Binding Protein-1 |
| IGFBP-2 | białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu 2; ang. ang. IGF -Binding Protein-2 |
| IL | interleukina; ang. Interleukin |

| | |
|-----------------------------|--|
| ION | nanocząstki tlenku żelaza; ang. Iron Oxide Nanoparticles |
| ISCT | Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej; ang. International Society for Cellular Therapy |
| ITGA4 | podjednostka α 4 integryny; ang. integrin subunit alpha 4 |
| ITGB1 | podjednostka β 1 integryny; ang. integrin subunit beta 1 |
| JAM | cząsteczka adhezyjna połączeń; ang. junctional adhesion molecule |
| KGF | czynnik wzrostu keratynocytów; ang. keratinocyte growth factor |
| LAT1 | transporter dużych aminokwasów 1; ang. L-type amino acid transporter 1 |
| LFA-1/ α L β 2 | antygen związany z czynnością limfocytów; ang. lymphocyte function-associated antigen 1 |
| MAC1 | integryna CD11b/CD18; ang. macrophage 1 |
| MadCAM-1 | cząsteczka adhezji komórkowej będąca adresyną błon śluzowych; ang. mucosal addressin cell adhesion molecule-1 |
| MAP2 | białko stabilizujące mikrotubule; ang. microtubule associated protein 2 |
| MCAM/CD146 | cząsteczka adhezyjna komórek czerniaka; ang. melanoma cell adhesion molecule |
| MCAO | zamknięcie tętnicy środkowej mózgu; ang. Middle Cerebral Artery Occlusion |
| mCherry | białko czerwonej fluorescencji mCherry; ang. mCherry |
| MCP-1 | białko chemotaktyczne dla monocytów; ang. monocyte chemoattractant protein 1 |
| M-CSF | czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów; ang. macrophage colony-stimulating factor |
| MIG | monokina indukowana przez interferon γ ; ang. monokine induced by interferon γ |
| miRNA | mikro RNA; ang. micro RNA |
| MLC | łańcuch lekki miozyny; ang. myosin light chain |
| MMP-2 | metaloproteaza macierzy pozakomórkowej 2; ang. matrix metalloproteinase 2 |
| MMP-9 | metaloproteaza macierzy pozakomórkowej 9; ang. matrix metalloproteinase 9 |
| Molday ION | nanocząstki tlenku żelaza skoniugowane z rodaminą B; ang. Iron Oxide Nanoparticles conjugated with Rhodamine B |
| MRI | rezonans magnetyczny; ang. magnetic resonance imaging |
| mRNA | informacyjny RNA; ang. messenger RNA |
| MSCs | mezenchymalne komórki macierzyste/mezenchymalne komórki zrębu; ang. mesenchymal stem cells/mesenchymal stromal cells |
| NF-160 | białko neurofilamentów o masie molekularnej 160 kDa; ang. 160 kDa Neurofilament protein |
| NF-200 | białko neurofilamentów o masie molekularnej 200 kDa; ang. 200 kDa Neurofilament protein |
| NF-68 | białko neurofilamentów o masie molekularnej 68 kDa; ang. 68 kDa Neurofilament protein |
| NG2 | neuroglikan-2; ang. neuroglycan-2 |
| NGF | czynnik wzrostu nerwów; ang. nerve growth factor |
| NK | naturalne komórki cytotoksyczne; ang. Natural Killers |
| N-kadheryna | kadheryna neuronalna; ang. neural cadherin |
| NPC | pregenitorowe komórki neuralne; ang. Neural Progenitor Cells |
| NSC | neuralne komórki macierzyste; ang. Neural Stem Cells |
| NT3 | Neurotrofina 3; ang. Neurotrophin 3 |
| OUN | ośrodkowy układ nerwowy; ang. central nervous system |
| PDGF-R β | receptor płytkopochodnego czynnika wzrostu typ β ; ang. β -type platelet-derived growth factor receptor |
| PECAM-1 | płytkowo-śródbłonkowa cząsteczka adhezji komórkowej; ang. platelet endothelial cell adhesion molecule |
| PET | pozytronowa tomografia emisyjna; ang. positron-emission tomography |
| PGE2 | prostaglandyna 2; ang. prostaglandin 2 |

| | |
|-----------------------------|---|
| PI3K | kinaza 3-fosfatydyloinozytolu; ang. phosphoinositide 3-kinase |
| PKA | kinaza białkowa A; ang. protein kinase A |
| PKC | kinaza białkowa C; ang. protein kinase C |
| PKG | kinaza białkowa G; ang. protein kinase G |
| PKH26 | znacznik fluorescencyjny |
| PKT | kinaza białkowa B; ang. protein kinase B |
| PSAP | Prosapozyna; ang. Prosaposin |
| PSGL-1 | ligand P selektyny; ang. P selectin ligand |
| RLuc | lucyferaza <i>Renilla reniformis</i> ; ang. <i>Renilla luciferase</i> |
| RNA | kwasy rybonukleinowe; ang. ribonucleic acid |
| SCF | czynnik komórek macierzystych; ang. stem cell factor |
| SDF-1 | czynnik podścieliska 1; ang. stromal cell-derived factor 1 |
| SEM | Semaforyna; ang. Semaphorin |
| Shh | cząsteczka sygnałowa Sonic hedgehog; ang. Sonic hedgehog |
| SLE ^x | cząsteczka sjalo-LewisX; ang. Sialyl-Lewis X |
| Sox | czynnik transkrypcyjny; ang. SRY - sex determining region Y |
| SPECT | tomografia emisyjna pojedynczych fotonów; ang. single-photon emission computed tomography |
| SPIO | superparamagnetyczne nanocząstki tlenku żelaza; ang. superparamagnetic iron oxide nanoparticles |
| <i>sr39TK</i> | gen reporterowy kodujący kinazę tymidynową wirusa opryszczki |
| SRC | rodzina kinaz tyrozynowych |
| SSB | białka wiążące jednoniciowy DNA; ang. Single Stranded Binding Proteins |
| SSEA4 | specyficzny antygen komórek zarodkowych 4; ang. Stage Specific Embryonic Antigen 4 |
| STRO-1 | antygen powierzchniowy obecny na komórkach podścieliska szpiku kostnego-1; ang. cell surface antigen expressed by stromal elements in human bone marrow-1 |
| T1 | czas relaksacji podłużnej; ang. spin-lattice relaxation time |
| T2 | czas relaksacji poprzecznej; ang. spin-spin relaxation time |
| Tc | Limfocyty T cytotoksyczne; ang. cytotoxic T cell |
| TGF- α | transformujący czynnik wzrostu α ; ang. transforming growth factor α |
| TGF β | transformujący czynnik wzrostu β ; ang. transforming growth factor β |
| Th | limfocyty T pomocnicze; ang. T helper cells |
| TIMP | tkankowy inhibitor metaloproteinaz ; ang. tissue inhibitor of metalloproteinases |
| TJ | połączenie ściste; ang. tight junction |
| TNF- α | czynnik martwicy nowotworu α ; ang. tumor necrosis factor α |
| USPIO | ultra-małe nanocząstki tlenku żelaza; ang. ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles |
| VCAM1 | cząsteczka adhezji komórkowej naczyń 1; ang. vascular cell adhesion molecule 1 |
| VEGF | czynnik wzrostu śródbłónka naczyń; ang. vascular endothelial growth factor |
| VE-kadheryna | kadheryna śródbłónka naczyniowego; ang. vascular endothelial cadherin |
| VLA-4/ α 4 β 1 | antygen bardzo późny 4; ang. very late antigen 4 |
| X-gal | 5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -D-galaktopiranozyd |
| YFP | białko żółtej fluorescencji; ang. Yellow fluorescent protein |
| ZO | obwódka zamykająca; ang. zona occludens |

STRESZCZENIE

Terapia regeneracyjna z wykorzystaniem komórek macierzystych w celu odtworzenia uszkodzonych tkanek i narządów jest przedmiotem zainteresowania środowisk medycznych i gremiów naukowych od kilkunastu lat. W początkowym okresie zakładano, iż przeszczepiane komórki egzogenne zastąpią zniszczone struktury w rejonie uszkodzenia. Obecnie wiadomo, iż pozytywne efekty transplantacji komórek macierzystych wynikają raczej z ich protekcyjnego działania i stymulacji endogennych procesów naprawczych niż przekształcania się tych komórek w dojrzałe komórki biorcy i ich wbudowywania w struktury tkanki. W ostatnich latach dużym zainteresowaniem wśród naukowców i klinicystów, również z punktu widzenia ich zastosowań terapeutycznych cieszą się mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs). Łatwość pozyskiwania MSCs z różnych źródeł, ich niska immunogenność i zdolności immunomodulacyjne sprawiają, iż mogą być przeszczepiane nie tylko w układzie auto-, ale również allogenicznym. Ponadto właściwości anty-apoptotyczne, parakryne i wielokierunkowa zdolność do różnicowania MSCs sprawia, że są one aktualnie wykorzystywane w próbach eksperymentalnych i klinicznych terapii najczęściej występujących chorób, w tym chorób neurologicznych obejmujących struktury ośrodkowego układu nerwowego (OUN), takich jak udar mózgu, choroba Alzheimera, stwardnienie zanikowe boczne, choroba Huntingtona, Parkinsona, stwardnienie rozsiane czy uszkodzenie rdzenia kręgowego, dla których brak jest skutecznych alternatywnych metod leczenia.

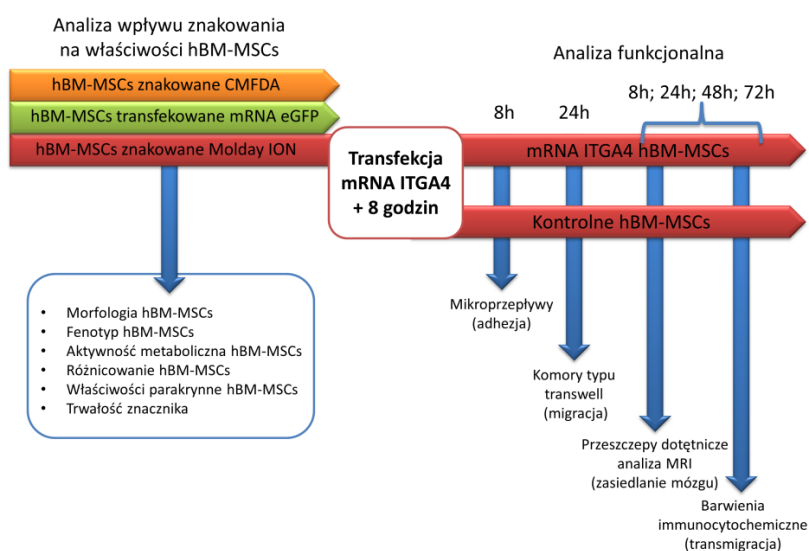
W dostępnych źródłach literaturowych możemy znaleźć prace pokazujące, że przeszczepiane MSCs podlegają mobilizacji do uszkodzonych tkanek w sposób aktywny, jednak mechanizm odpowiedzialny za ten proces nie został jak dotąd poznany. Ponadto, zasiedlanie rejonów uszkodzenia w tkance przez systemowo podane komórki jest dużo mniej wydajne w przypadku MSCs niż leukocytów, czego przyczyną może być brak ekspresji istotnych dla tego procesu receptorów oraz białek adhezyjnych. Zwiększenie ekspresji białek odpowiedzialnych za adhezję i migrację może mieć pozytywny wpływ na przechodzenie przeszczepianych komórek z łożyska naczyniowego i ich mobilizację do rejonu uszkodzenia. Stąd też rozwój metod zwiększających migrację systemowo podanych komórek do mózgu wydaje się być istotny w celu podniesienia wydajności terapii z użyciem egzogennych MSCs w chorobach neurologicznych. Badania Gorelik i wsp. (Gorelik i in., 2012) wykazały, że wywołanie w progenitorach glejowych (GRPs) nad-ekspresji cząsteczek adhezyjnych VLA-4, białka zaangażowanego fizjologicznie w proces diapedezy leukocytów, skutkowało zwiększonym gromadzeniem się zmodyfikowanych GRPs w naczyniach mózgu po iniekcji dotętnicznej. Obserwacje te stanowiły asumpt do zaprojektowania badań, będących przedmiotem mojej pracy doktorskiej. Istotą tych badań była analiza etapów diapedezy, niezbędnych w procesie transmigracji ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego (hBM-MSCs) wykazujących zwiększoną ekspresją receptora VLA-4. Ocena migracji, lokalizacji tkankowej oraz stopnia zasiedlania uszkodzonych obszarów, również w badaniach długoterminowych stwarza konieczność stosowania najbardziej neutralnych znaczników, umożliwiających zachowanie prawidłowej morfologii i niezmiennych funkcji komórek po ich transplantacji, a także sprawowanie precyzyjnej kontroli podczas procesu podawania chorym komórek macierzystych.

Celem moich badań było zweryfikowanie hipotezy czy zwiększenie ekspresji integryny VLA-4 w hBM-MSCs pozwoli na wzmocnienie ich właściwości adhezyjnych i transmigracyjnych po transplantacji systemowej u szczurów w modelu uszkodzenia mózgu.

Badania wstępne miały na celu wybór barwnika do przyżyciowego znakowania hBM-MSCs, który nie zmieniałby cech biologicznych znakowanych komórek jednocześnie umożliwiając ich identyfikację w długoczasowych eksperymentach prowadzonych w warunkach *in vitro* i *in vivo*.

Przedmiotem badań były ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego (LONZA) z wywołaną nad-ekspresją VLA-4. Komórki te uzyskano poprzez transfekcję mRNA ITGA4 kodującym podjednostkę $\alpha 4$ integryny VLA-4 według metody opracowanej w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej (Nowakowski, Andrzejewska i wsp. 2017). Badania funkcjonalne hBM-MSCs *in vitro* wykonano z użyciem komór mikroprzepływowych (*microfluid device*) i komór migracyjnych typu *transwell*. Doświadczenia *in vivo* przeprowadzono u dorosłych szczurów stada Wistar w modelu ogniskowego uszkodzenia mózgu z zastosowaniem inhibitora pompy sodowo-potasowej (ouabainy) opracowanego w naszym zespole (Janowski i in., 2008).

Schemat przeprowadzonych doświadczeń



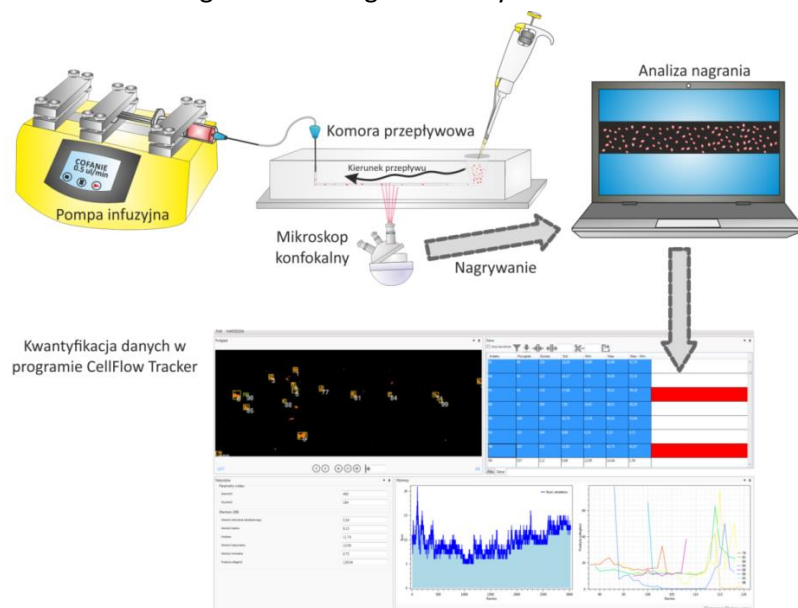
I etap moich badań dotyczył oceny przydatności wybranych przyżyciowych barwników zastosowanych do znakowania komórek hBM-MSCs w celu ich wizualizacji w dalszych eksperymentach. Prowadzone badania obejmowały analizę porównawczą wpływu trzech typów znaczników: CellTracker™ Green CMFDA (Life Technologies, CMFDA), mRNA eGFP (Stemgent) i Molday ION (BiOPAL, Molday) na morfologię i funkcje znakowanych hBM-MSCs. Istotą tych badań było wytypowanie przyżyciowego barwnika optymalnego dla hBM-MSCs, który nie zmieniałby cech biologicznych znakowanych komórek, a jednocześnie umożliwiłby ich identyfikację w długoczasowych eksperymentach prowadzonych zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Wyniki tych badań wykazały, że z wykorzystanych do przyżyciowego znakowania hBM-MSCs trzech różnych barwników fluorescencyjnych najbardziej użyteczny okazał się Molday ION zawierający nanocząstki tlenku żelaza i rodaminę B. Znacznik ten długo utrzymywał się w komórkach hBM-MSCs podczas ich hodowli *in vitro*. Komórki hBM-MSCs wyznakowane Molday ION zachowywały prawidłowe cechy morfologiczne i fenotypowe, prezentowały porównywalny z komórkami natywnymi poziom aktywności metabolicznej oraz ekspresji większości czynników wzrostu i zdolność do różnicowania w kierunku adipocytów i osteoblastów. Na podstawie powyższych wyników badań hBM-MSCs znakowane Molday ION zostały

wybrane do badań w dalszych moich eksperymentach. Rodamina B, która wykazuje silne właściwości fluorescencyjne pozwoliła na identyfikację znakowanych komórek zarówno w hodowli *in vitro* jak i po przeszczepie w tkance *post mortem*. Właściwości ferromagnetyczne, jakie posiadają nanocząstki żelaza będące składową częścią znacznika Molday ION umożliwiły natomiast wizualizację wyznakowanych hBM-MSCs w czasie rzeczywistym podczas infuzji komórek, a także ich obserwację w dalszej sekwencji czasowej po ich transplantacji u żywych zwierząt, z użyciem MRI.

Kolejne eksperymenty stanowiły główny nurt moich badań, jakim było porównanie właściwości biologicznych hBM-MSCs natywnych i wykazujących nad-ekspresję receptora VLA-4 uczestniczącego w adhezji i transmigracji komórek w warunkach *in vitro* i *in vivo* po transplantacji systemowej u szczurów w modelu uszkodzenia mózgu. Komórki hBM-MSCs z nad-ekspresją VLA-4 zostały przez nas otrzymane metodą modyfikacji genetycznej z udziałem mRNA ITGA4. Wyniki badań ujawniły, że transfekcja wymienionym konstruktem powoduje, iż w komórkach pojawia się mRNA kodujące podjednostkę $\alpha 4$ integryny VLA-4, która nie występuje w natywnych hBM-MSCs. W zmodyfikowanych genetycznie komórkach, najwyższy poziom ekspresji białka $\alpha 4$ obecnego w błonie komórkowej obserwuje się w okresie 8-12 godzin od wprowadzenia mRNA ITGA4 do komórek.

II etap moich badań miał na celu porównanie właściwości biologicznych dwóch rodzajów komórek znakowanych Molday ION *in vitro*, w tym hBM-MSCs natywnych i wykazujących nad-ekspresję receptora VLA-4. Istotą badań była ocena ruchu i przylegania zmodyfikowanych przez transfekcję mRNA ITGA4 komórek hBM-MSCs poprzez zastosowanie zaadaptowanej do naszych celów techniki mikroprzepływów. Do badań służyły komory przepływowe (microfluidic device) będące układem bardzo precyzyjnych mikrokanałów, które stanowią model naczyń kapilarnych, a obserwowany w nich laminarny przepływ imituje warunki panujące w układzie krwionośnym. W naszych doświadczeniach komórki hBM-MSCs podawane do otworu wpustowego przemieszczały się przez kanał komory przepływowej. Przezroczystość kamery pozwalała na obserwację zachowania przepływających komórek oraz ilościową ocenę ich przylegania. Przeprowadzane eksperymenty były nagrywane kamerą połączoną z mikroskopem konfokalnym, a pochodzące z nich filmy analizowano manualnie bądź przy użyciu opracowanego do tych celów specjalnego programu CellFlowTracker.

Schemat układu doświadczalnego stosowanego do oceny ruchu komórek hBM-MSCs *in vitro*



Dzięki zastosowaniu wielkoskalowej zautomatyzowanej analizy danych generowanych przez opracowany do naszych doświadczeń program CellFlowTracker wykazano, że podczas przepływu komórek przez kanał komory zarówno natywne jak i modyfikowane mRNA ITGA4 hBM-MSCs podlegają procesom toczenia i pełzania, analogicznym do etapów obserwowanych podczas diapedezy leukocytów w naczyniach krwionośnych. Analizując wyniki moich badań okazało się, że hBM-MSCs modyfikowane przez wprowadzenie mRNA ITGA4 charakteryzują się wzmożoną aktywnością adhezyjną, co skutkuje zwiększeniem liczby komórek, które zatrzymują się podczas przepływu przez komorę (microfluidic device). Wzrost zdolności przylegania komórek transfekowanych mRNA ITGA4 został potwierdzony w badaniach z wykorzystaniem dwukomorowych szalek hodowlanych typu *transwell*. hBM-MSCs wykazujące nad-ekspresję VLA-4 silniej wiązały się z błoną półprzepuszczalną górnej komory w porównaniu z komórkami niemodyfikowanymi, zatrzymując się na górnej powierzchni błony, co ograniczało ich zdolność migracji.

Powyższe informacje stały się inspiracją do przeprowadzenia III etapu moich badań, który miał za zadanie ocenę funkcjonalną *in vivo* hBM-MSCs transfekowanych mRNA ITGA4, a w szczególności zdolności zasiedlania przez nie mózgu szczura po przeszczepie dotętniczym w eksperymentalnym modelu uszkodzenia prążkowiec *ouabainą*. Komórki hBM-MSCs charakteryzujące się zwiększoną ekspresją podjednostki $\alpha 4$ integryny VLA-4 lub komórki natywne niemodyfikowane genetycznie przeszczepiano dotętniczo, do tętnicy szyjnej wewnętrznej, szczurom po 48 godzinach od wykonania uszkodzenia prążkowiec. Proces napływu komórek do mózgu podczas ich transplantacji był monitorowany w czasie rzeczywistym przy użyciu obrazowania w rezonansie magnetycznym. Wyniki badań wykazały, że hBM-MSCs znakowane Molday ION napływały do prawej uszkodzonej półkuli. Na podstawie intensywności sygnału, generowanego przez nanocząstki tlenku żelaza w MRI można wnioskować, że więcej hBM-MSCs z nad-ekspresją VLA-4 w stosunku do komórek natywnych niemodyfikowanych genetycznie, było widocznych w okolicy lezji. Badania immunohistochemiczne potwierdziły wyniki uzyskane w MRI. Podczas prowadzonych przez nas dalszych obserwacji okazało się, że hBM-MSCs pozostawały w obrębie naczyń krwionośnych mózgu. Po 72 godzinach od transplantacji niektóre z komórek były widoczne w przestrzeni periwaskularnej.

Uzyskane wyniki przeprowadzonych badań pozwalają sformułować następujące wnioski:

- dobór znaczników w celu wizualizacji komórek nakłada obowiązek przeprowadzania restrykcyjnej oceny właściwości komórek po ich znakowaniu w każdym nowym układzie doświadczalnym przed przystąpieniem do transplantacji
- transfekcja ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego mRNA ITGA4 indukuje ekspresję podjednostki $\alpha 4$ integryny VLA-4, zwiększając zdolność adhezji zmodyfikowanych komórek zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* po ich transplantacji
- zwiększenie ekspresji receptora VLA-4 na powierzchni hBM-MSCs skutkuje efektywnym gromadzeniem się przeszczepianych komórek w naczyniach krwionośnych mózgu przebiegających w pobliżu lezji
- wydaje się, że wzmocnienie ekspresji dodatkowych receptorów na komórkach podawanych systemowo mogłoby promować ich przechodzenie przez ścianę naczyń krwionośnych i ukierunkowaną migrację

ABSTRACT

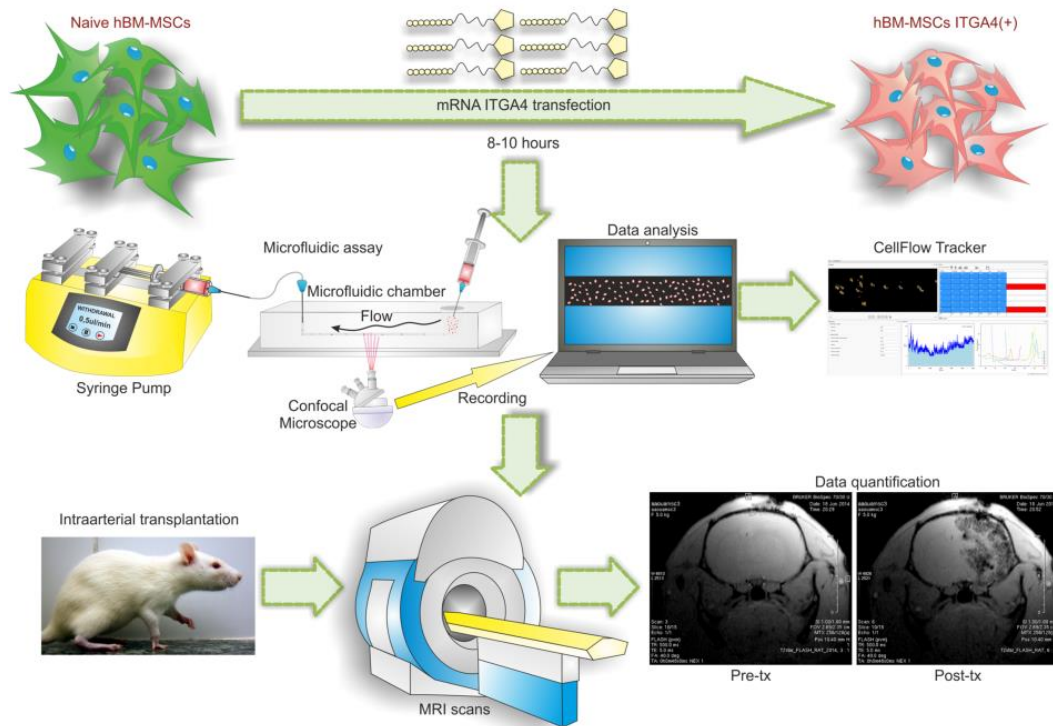
SINGLE-CELL, HIGH-THROUGHPUT, REAL-TIME *IN VITRO* AND *IN VIVO* ANALYSIS OF mRNA ITGA4-ENGINEERED HUMAN MESENCHYMAL STEM CELL DOCKING TO VESSEL WALL

Neurologic impairments are usually irreversible as a result of limited regeneration in the central nervous system. Therefore, based on the regenerative capacity of stem cells, transplantation therapies of various stem cells have been tested in basic research and preclinical trials, and some have shown great prospects. While, neural stem cells (NSCs) seem to be an optimal choice for therapeutic intervention in the central nervous system; however, to date majority of studies report trophic and immunomodulatory effect rather than neuronal replacement as primary therapeutic mechanisms. Previous work with NSCs indicates that long-term survival and integration with host tissue is not observed and therapeutic effects could rather be linked to the paracrine activity. With this evidence it was prudent to switch to mesenchymal stem cells (MSCs), which are known for paracrine and immunomodulatory potential, as well as they are easily obtainable from various sources such as bone marrow, adipose tissue and others. Mesenchymal stem cells (MSCs) were shown to be therapeutic in animal models of stroke, regardless of the delivery route. However, certain routes have important limitations in the acute stage of stroke. For intravenous delivery, the therapeutic effect is dose-dependent and requires very large cell doses that are difficult to achieve clinically. Furthermore, the high doses may lead to pulmonary embolism. Intra-parenchymal deliveries require neurosurgery, and, on admission, patients with stroke receive blood-thinning agents; thus, they are poor candidates for surgeries due to the high risk of intracerebral hematoma formation. In contrast, blood thinning facilitates intra-arterial interventions. The recent advances in thrombectomy have rapidly revolutionized the effective management of stroke beyond the acute phase, thus it has provided substantial support for intra-arterial procedures. Following that path, there is a significant effort to design post-thrombectomy intra-arterial adjuvant therapies. Intra-arterial delivery of MSCs at optimized, low dose has already been shown effective in a rodent model of stroke. However, the low engraftment rate requires strategies that would increase docking and transmigration of intra-arterially delivered stem cells to further advance the therapeutic effects. It was shown initially that neural stem cells (NSCs) sorted for the high expression of integrin alpha 4 (ITGA4), a subunit of the VLA-4 heterodimer adhesion molecule, more effectively engrafted after intra-arterial delivery, which translated to a better behavioral effect in a mouse stroke model. In further studies, the expression of both subunits of VLA-4 was achieved in glial-restricted precursors (GRPs) through DNA plasmid-based genetic engineering, and both docking to the inflamed endothelium and transmigration were demonstrated in an animal model of stroke. MSCs abundantly express the integrin β_1 subunit (ITGB1), but scarcely express ITGA4, which is required to produce the complete VLA-4 heterodimer. Since DNA plasmid-based transfection is challenging in MSCs, we have developed an mRNA-based strategy to express ITGA4 in MSCs. We hypothesized that overexpression of ITGA4 in human bone marrow derived mesenchymal stem cells (hBM-MSCs) would improve their docking ability and we validated our experimental setup comparing their properties against native cells. Here, we studied mRNA ITGA4-engineered hBM-MSCs in an *in vitro* model of inflamed endothelium and *in vivo* in animals with focal brain injury. Our study focused on investigating initial steps of diapedesis as they are indispensable for transmigration and effective homing of cells administered intra-arterially.

For *in vitro* experiments, we created microfluidic platform for screening the docking properties of hBM-MSCs. *In vivo* studies have concerned the analysis of hBM-MSCs homing to the brain after their

intra-arterial transplantation in an animal model of focal brain injury. Molday ION Rhodamine B™ (MIRB; BioPAL) was selected as a cell tag due to its neutrality to MSCs, as well as dual fluorescent (rhodamine) and magnetic (iron oxide) properties that are convenient for cell tracking both in a microfluidic assay (fluorescence) and after transplantation in animals (MRI).

Schematic overview of experimental design



Based on our studies we have developed and validated a software application (CellFlow Tracker) capable of single-cell, high-throughput, real-time, fully automated analysis of the process of cell docking *in vitro*, using a microfluidic assay. The software provides a high degree of flexibility and additional, customized parameters can be programmed. Therefore, the CellFlow Tracker adds a new dimension to studies of cell docking in a model of the arterial wall by enabling large-scale analyses of microfluidic assays. In our study we used the microfluidic model of activated endothelium consisting of a channel coated with VCAM1 protein since this receptor, abundantly expressed on activated endothelial cells, is the main ligand for VLA-4. The behavior of hBM-MSCs follows a movement pattern that is similar to the diapedesis of leukocytes through the blood brain barrier, including rolling and crawling. Cells in both experimental and control groups were capable of docking to the surface of microfluidic channels; however, the percentage of arrested cells was significantly higher in case of mRNA ITGA4-engineered cells than control hBM-MSCs (42.01 % vs 9.41 %). There was no difference in cell size between the groups, which excluded the contribution of cell size to the observed differences in cell velocity. We were the first to show that hBM-MSCs docking can be enhanced through mRNA ITGA4 engineering.

Then we have validated our *in vitro* results with *in vivo* experiments showing the functionality of our system. In a rat model of focal brain injury induced by ouabain injection into striatum a relatively

good number of transplanted hBM-MSCs stopped in the cerebral vasculature. MRI scans showed that intra-arterially induced cells were captured in the vessels in the area of lesion. The quantitative analysis of acquired images confirmed *in vitro* findings that more mRNA ITGA4-engineered hBM-MSCs docked to the inflamed cerebral vasculature, compared to control cells.

The higher accumulation of systemically transplanted hBM-MSCs in the area of injury achieved due to mRNA ITGA4 transfection can potentially enhance the effect of stem cells treatment and can potentially be a valuable tool for regenerative medicine, including neurological disorders.

INNOWACYJNOŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

- Przeprowadzenie modyfikacji genetycznej ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego (hBM-MSCs) w oparciu o transfekcję komórek przy użyciu cząsteczek mRNA z wykorzystaniem czapeczki typu ARCA (ang. anti-reverse cap analog)
- Uzyskanie komórek hBM-MSCs transfekowanych mRNA ITGA4 ze zwiększoną zdolnością do dokowania w warunkach *in vitro* i *in vivo*
- Opracowanie metody akwizycji obrazu z częstotliwością 250 Hz umożliwiającą śledzenie ruchu komórek przepływających w komórce przepływowej zachodzącego w milisekundach za pomocą kamery połączonej z mikroskopem semi-konfokalnym
- Stworzenie oprogramowania mającego na celu automatyzację kwantyfikacji nagrań uzyskanych z eksperymentów przeprowadzonych z zastosowaniem komór mikroprzepływowych
- Sformułowanie algorytmu analizy umożliwiającego wykazanie zachodzenia etapów zatrzymania, toczenia się i pełzania komórek podczas ich przepływu przez komorę przepływową hBM-MSCs na podstawie porównania zbiorów danych liczbowych opisujących ruch komórek
- Obrazowanie przeszczepianych dotętniczo hBM-MSCs w tomografie rezonansu magnetycznego w czasie rzeczywistym zapewniające kontrolę nad dystrybucją podawanych komórek
- Wykazanie obecności przeszczepianych dotętniczo hBM-MSCs w przestrzeni periwaskularnej naczyń krwionośnych mózgu szczura z ogniskowym uszkodzeniem mózgu w trzecim dniu od podania

1. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

Terapia regeneracyjna z wykorzystaniem komórek macierzystych w celu odtworzenia uszkodzonych tkanek i narządów jest przedmiotem zainteresowania środowisk medycznych i gremiów naukowych od kilkunastu lat. W początkowym okresie zakładano, iż przeszczepiane komórki egzogenne zastąpią zniszczone struktury w rejonie uszkodzenia. Obecnie wiadomo, iż pozytywne efekty transplantacji komórek macierzystych wynikają raczej z ich protekcyjnego działania i stymulacji endogennych procesów naprawczych niż przekształcania się tych komórek w dojrzałe komórki biorcy i ich wbudowywania w struktury organizmu. W ostatnich latach dużym zainteresowaniem wśród naukowców i klinicystów, również z punktu widzenia ich zastosowań terapeutycznych w chorobach neurologicznych, cieszą się mezenchymalne komórki macierzyste.

1.1. Mezenchymalne komórki macierzyste/komórki zrębu

1.1.1. Historia odkrycia mezenchymalnych komórek macierzystych i ich nazewnictwo

Mezenchymalne komórki macierzyste zwane również mezenchymalnymi komórkami zrębu (MSCs; ang. mesenchymal stem cells/stromal cells) zostały odkryte przez Alexandra Friedensteina na przełomie lat 60 i 70 XX wieku. Friedenstein był jednym z pionierów teorii mówiącej o szpiku kostnym, jako rezerwuarze komórek macierzystych tkanek mezenchymalnych u dorosłych organizmów. Jego odkrycie było poprzedzone własnymi obserwacjami, iż przeszczepienie szpiku kostnego w nietypowy obszar organizmu, np. do torebki nerki, skutkuje w tej lokalizacji nie tylko proliferacją komórek szpiku kostnego, ale również uformowaniem kości (Friedenstein, Petrakova, Kurolesova i Frolova, 1968). Wskazywało to na istnienie w szpiku kostnym drugiej, poza komórkami hematopoetycznymi, populacji komórek macierzystych dającej początek prekursorom kości - osteoblastom. Ze względu na zdolność tych komórek do tworzenia prekursorów kostnych Friedenstein nadał im nazwę osteogenicznych komórek macierzystych. Friedenstein, jako pierwszy wyizolował ze szpiku kostnego adherentne komórki o kształcie zbliżonym do fibroblastów ze zdolnością do szybkiego wzrostu w warunkach *in vitro* w postaci klonogennych kolonii (CFU-F; jednostki formowania kolonii; ang. colony forming unit-fibroblastoid). Komórki te charakteryzowały się zdolnością do różnicowania nie tylko w kierunku osteoblastów, ale także chondrocytów i adipocytów jak również, po przeszczepieniu kolonii CFU-F do organizmu biorcy, współtworzenia mikro-środowiska szpiku kostnego, w postaci komórek podścieliska (Friedenstein, Chailakhjan i Lalykina, 1970; Luria, Panasyuk i Friedenstein, 1971). W roku 1991 Caplan w swojej pracy zaproponował użycie terminu „mezenchymalne komórki macierzyste” ze względu na ich zdolność do różnicowania w więcej niż jeden typ komórek współtworzących tkankę łączną w wielu narządach (Caplan, 1991). Nazwa ta zyskała bardzo dużą popularność i jest aktualnie najczęściej stosowaną, jednak nasunęła wątpliwości w kwestii uzasadnionego przypisywania komórkom odkrytym przez Friedensteina tak wysokiego stopnia macierzystości (Bianco, Robey i Simmons, 2008). Współcześnie w literaturze funkcjonuje wiele zamienników rozwinięcia skrótu MSCs, w tym: Multipotentjalne Komórki Stromalne (ang. Multipotent Stromal Cells), Szpikowe Komórki Stromalne (ang. Marrow Stromal Cells), Mezodermalne Komórki Macierzyste (ang. Mesodermal Stem Cells), Mezenchymalne Komórki Stromalne (ang. Mesenchymal Stromal Cells) oraz wiele innych. W swoich najnowszych pracach Caplan zaleca zmianę nazwy opisywanych komórek na „Lecznice Komórki Sygnalizacyjne” (ang. Medicinal Signaling Cells) ze względu na podkreślenie mechanizmu ich leczniczego działania po przeszczepie, który jak się sądzi opiera się głównie na wydzielaniu czynników stymulujących procesy regeneracyjne (Caplan, 2017).

1.1.2. Źródła i techniki izolacji mezenchymalnych komórek macierzystych

Szpiczek kostny był historycznie pierwszym źródłem, z którego pozyskane zostały MSCs jednak wraz z upływem czasu pojawiły się doniesienia o możliwościach izolacji z innych źródeł komórek o zbliżonych właściwościach. Komórki mezenchymalne są pozyskiwane zarówno z tkanek i wydzielin dorosłego organizmu, takich jak tkanka tłuszczowa (Katz i in., 2005), krew obwodowa (Kassis i in., 2006), miazga zęba (Agha-Hosseini i in., 2010), więzadło żółte (Chen i in., 2011), krew menstruacyjna (Meng i in., 2007), endometrium (Macias i in., 2010), mleko matki (Patki, Kadam, Chandra i Bhone, 2010), jak i tkanek pochodzenia płodowego: płynu owodniowego (Roubelakis i in., 2007), błon płodowych (Marongiu i in., 2010), wypustek kosmówki (Poloni i in., 2008), łożyska (Miao i in., 2006), sznura pępowiny (Girdlestone, Limbani, Cutler i Navarrete, 2009), galarety Warthona (Zeddou i in., 2010) i krwi pępowinowej (Erices, Conget i Minguell, 2000).

Pozyskiwanie MSCs z różnych źródeł wiązało się z opracowaniem zróżnicowanych metod ich separacji. Najczęstszą techniką stosowaną w przypadku izolacji MSCs ze szpiku kostnego jest aspiracja szpiku, po której następuje wirowanie pozyskanego materiału w gradiencie stężeń w celu uzyskania komórek jednojądrzastych. W kolejnym etapie komórki te są przenoszone do naczynia hodowlanego gdzie MSCs, z uwagi na swoje właściwości do wzrostu w postaci adherentnej, stopniowo osiadają i przyklejają się do podłoża. Część badaczy w swoich protokołach pomija etap wirowania aspiratu i opiera izolację komórek wyłącznie na zdolności MSCs do adhezji do plastikowego podłoża szalki (Pittenger i in., 1999). Materiał do izolacji komórek pochodzących z tkanki tłuszczowej pobierany przy zabiegach liposukcji, jest trawiony enzymatycznie przy użyciu kolagenazy, a kolejne etapy do uzyskania MSCs to wirowanie, płukanie, filtracja i umieszczenie komórek w szalce hodowlanej (Kuhbier i in., 2010). Proponowaną metodą pozyskiwania MSCs z krwi obwodowej jest stosowanie kulek opłaszczonych fibryną, które pozwalają na wyizolowanie komórek jednojądrzastych, a następnie wyodrębnienie spośród nich populacji komórek mezenchymalnych (Kassis i in., 2006). Porównując wydajność izolacji MSCs z tkanek organizmów dorosłych wydaje się, że najlepszym ich źródłem jest tkanka tłuszczowa, z której można otrzymać nawet 500 razy większą liczbę komórek niż używając jej odpowiednika wagowego aspiratu szpiku kostnego (Schneider, Unger, van Griensven i Balmayor, 2017). Dużą zaletą izolacji MSCs z tkanek płodowych jest stosunkowo łatwa dostępność materiału, którego pozyskanie nie wymaga wykonywania dodatkowych, inwazyjnych procedur. Uzyskane fragmenty tkanek są trawione przy użyciu trypsyny a następnie hodowane w naczyniu hodowlanym przez 2-3 dni, podczas których MSCs migrują na zewnątrz eksplantu gdzie rosną w postaci hodowli płaskiej jednowarstwowej (Beeravolu i in., 2017). Jednak zarówno w badaniach eksperymentalnych jak i próbach klinicznych szpiczek kostny pozostaje najczęściej używanym i najlepiej scharakteryzowanym źródłem MSCs.

1.1.3. Heterogenność populacji mezenchymalnych komórek macierzystych

Ocena MSCs izolowanych z różnych tkanek wykazała, że istnieją różnice pomiędzy populacjami komórek uzyskanymi z poszczególnych źródeł. Wyniki badań udowodniły, że MSCs pochodzenia płodowego w porównaniu do komórek izolowanych z tkanek organizmów dorosłych cechują się szybszym tempem proliferacji jak również większą liczbą pasażu poprzedzających wejście, hodowanych *in vitro* MSCs, w etap starzenia się (Hass, Kasper, Böhm i Jacobs, 2011). Jednak MSCs pozyskane ze szpiku kostnego i tkanki tłuszczowej są w stanie utworzyć większą liczbę kolonii CFU, co pośrednio wskazuje na wyższy stopień ich macierzystości. Zestawienie profilu ekspresji genów typowych dla komórek pluripotentnych pokazuje, że jedynie w komórkach izolowanych ze szpiku kostnego możemy obserwować ekspresję genu *SOX2*, którego aktywacja związana jest z procesem samoodnowy komórek

macierzystych jak również, z neurogenezą podczas rozwoju zarodkowego (Heo, Choi, Kim i Kim, 2016). Opisano również rozbieżności w zdolności do różnicowania MSCs pozyskanych z różnych źródeł. W literaturze możemy znaleźć prace, których autorzy zaobserwowali brak różnicowania MSCs pochodzących z krwi pępowinowej w kierunku adipocytów jak również większą skłonność MSCs ze szpiku kostnego i tkanki tłuszczowej do różnicowania w kierunku osteoblastów (Heo i in., 2016).

Poza rozbieżnościami obserwowanymi pomiędzy komórkami MSCs pochodzącymi z różnych źródeł wykazano również odrębności związane z pozyskiwaniem ich od poszczególnych dawców. Wśród komórek izolowanych ze szpiku kostnego od dawców w różnym wieku i o różnej płci odnotowano nawet 12-krotne różnice w tempie ich proliferacji i zdolności do osteogenezy, połączonej z 40-krotną różnicą poziomu aktywności markera przebudowy tkanki kostnej – ALP (fosfataza zasadowa; ang. alkaline phosphatase). Przy czym nie stwierdzono żadnych korelacji wynikających z różnic płci lub wieku dawców (Phinney i in., 1999). Jednak wyniki badań innych autorów wskazują, że właściwości wyizolowanych ze szpiku kostnego MSCs są silnie związane z wiekiem dawcy. Komórki pobrane od starszych dawców charakteryzują się zwiększonym odsetkiem komórek apoptotycznych i starzejących się, wolniejszym tempem proliferacji, co wiąże się z wydłużonym czasem podwojenia ich populacji. Obserwuje się również osłabioną zdolność MSCs pochodzących od starszych dawców do różnicowania w kierunku osteoblastów (Zhou i in., 2008). Heo w swojej pracy pokazuje zróżnicowaną zdolność MSCs do osteogenezy łącząc to z różnym poziomem ekspresji genu *DLX5* (czynnik transkrypcyjny z motywem homeodomeny 5; ang. distal-lex homeodomain protein 5) u poszczególnych dawców, niezależną natomiast od rodzaju tkanki, z której komórki zostały wyizolowane (Heo i in., 2016).

Kolejnym etapem, na którym możemy obserwować różnorodność wśród populacji MSCs jest hodowla *in vitro*. Morfologia hodowanych komórek, wywodzących się z tej samej izolacji pozwala na zróżnicowanie ich na trzy sub-populacje. Obserwowane są: proliferujące komórki o wrzecionowatym kształcie, przypominające fibroblasty (typ I); duże, płaskie komórki z wyraźnie zaznaczoną strukturą cytoszkieletu, zawierające liczne ziarnistości (typ II) i małe, okrągłe komórki o dużej zdolności do samoodnowy (Colter, Sekiya i Prockop, 2001; Colter, Class, DiGirolamo i Prockop, 2000). Wśród nich typ I stanowią komórki progenitorowe dla typu II, które same nie podlegają już podziałom komórkowym i rozpoczęły proces starzenia (Mets i Verdonk, 1981; Whitfield, Lee i Van Vliet, 2013). Pierwotna hipoteza zakładała, że wszystkie komórki tworzące populację MSCs są multipotencjalne, a każda kolonia CFU jest zdolna do różnicowania w adipocyty, chondrocyty i osteoblasty, co zostało potwierdzone stosownymi badaniami (Muraglia, Cancedda i Quarto, 2000). Jednak w literaturze możemy znaleźć doniesienia, że linie komórkowe, pozyskane ze wspólnej kolonii CFU, różnią się od siebie właściwościami, charakteryzując się uni-, di- lub multipotencją (Okamoto i in., 2002). Niektórzy z autorów wykazali podział klonogennych kolonii MSCs aż na osiem grup różniących się od siebie potencjałem do różnicowania. Przy czym sugeruje się istnienie hierarchii w obrębie, której komórki współtworzące podrzędne względem siebie kolonie są coraz silniej ukierunkowane w stronę osteo-chondro- lub adipocytów i stopniowo tracą swoje właściwości multipotencjalne na rzecz di- i unipotencjalnych. Przemiana ta może być też związana ze spadkiem tempa proliferacji komórek i poziomu ekspresji białka CD146 (CD; kompleks różnicowania; ang. cluster of differentiation) – proponowane, jako marker komórek multipotentnych (Russell i in., 2010).

Reasumując, komórki znane pod wspólną nazwą MSCs stanowią heterogenną populację, której właściwości różnią się zarówno w zależności od tkanki jak i od dawcy, od których są pozyskiwane.

1.1.4. Kryteria identyfikacji mezenchymalnych komórek macierzystych

W związku z narastającymi kontrowersjami odnośnie nomenklatury, stopnia macierzystości i charakterystyki odkrytych przez Friedensteina komórek Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej (ISCT; ang. International Society for Cellular Therapy) w roku 2006 opublikowało swoje stanowisko precyzujące kryteria definiujące populację MSCs, które zostało zaakceptowane przez ogólnościowe środowisko naukowe. Wytyczne te rekomendują stosowanie nazwy multipotencjalne mezenchymalne komórki zrębu, jednak nazwa mezenchymalne komórki macierzyste wciąż pozostaje najczęściej używaną. W dalszej części mojej pracy doktorskiej dla ujednoczenia nazewnictwa stosowany będzie akronim MSCs. Warunkiem identyfikacji MSCs jest wzrost komórek *in vitro* w postaci populacji przylegającej do podłoża, jak również, w przypadku komórek pochodzenia ludzkiego, fenotyp charakteryzujący się obecnością antygenów powierzchniowych CD73, CD90, CD105 i brakiem ekspresji białek takich jak: CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a lub CD19 czy antygenów układu zgodności tkankowej klasy II (HLA II; antygeny ludzkich leukocytów klasy II; ang. human leukocyte antigens class II). Ponadto komórki te muszą posiadać zdolność do różnicowania się w kierunku osteoblastów, adipocytów i chondroblastów (Horwitz i in., 2005; Dominici i in., 2006). Poza markerami wymienionymi w wytycznych ISCT dodatkowo przydatne w wyodrębnieniu populacji ludzkich MSCs ze szpiku kostnego okazały się być antygeny: STRO-1 (antygen komórek stromy szpiku kostnego-1; ang. cell surface antigen expressed by stromal elements in human bone marrow-1), VCAM/CD106 i MCAM/CD146 (cząsteczka adhezyjna komórek czerniaka; ang. melanoma cell adhesion molecule), które charakteryzują komórki rosnące w warunkach *in vitro* w postaci przyklejonej do podłoża, o wysokim stopniu klonogenności i zdolności do różnicowania wielokierunkowego (Simmons i Torok-Storb, 1991; Gronthos i in., 2003; Sacchetti i in., 2007).

1.1.5. Pochodzenie mezenchymalnych komórek macierzystych

Wspólny człon „mezenchymalne” w obydwu wersjach rozwinięcia skrótu MSCs wywodzi się od terminu mezenchyma, którego synonimami są tkanka mezenchymalna lub tkanka łączna zarodkowa. Jest on używany w odniesieniu do grupy komórek obecnych wyłącznie u rozwijającego się zarodka wywodzących się głównie z trzeciego listka zarodkowego - mezodermy. Komórki te podczas rozwoju organizmu migrują i rozprzestrzeniają się w obrębie całego ciała zarodka. Dają one początek komórkom budującym u dorosłych organizmów tkankę łączną, współtworząc kości, chrząstki, ścięgna, więzadła, mięśnie i szpik kostny. Szeroko rozpowszechniony jest podgląd o wyróżnicowywaniu się MSCs w trakcie rozwoju zarodkowego z komórek mezenchymy (Caplan, 1991). Związane jest to między innymi z zaobserwowaną zbieżnością w ekspresji markerów takich jak: wimentyna, laminina β 1, fibronektyna i osteopontyna typowych dla komórek mezodermy w czasie rozwoju zarodkowego, a także charakterystycznych dla hodowanych *in vitro* adherentnych komórek zrębu szpiku kostnego (Dennis i Chabord, 2002). Jednak prawdziwe pochodzenie MSCs nie jest znane. W literaturze możemy znaleźć doniesienia wskazujące, że są one ontogenetycznie związane z grupą komórek wywodzących się z ektodermy pochodząc od komórek Sox1⁺ (czynnik transkrypcyjny Sox; ang. SRY - sex determining region Y) tworzących w trakcie rozwoju zarodkowego neuroektodermę i grzebień nerwowy. Komórki te zasiedlają u nowo narodzonych myszy szpik kostny i spełniają kryteria MSCs. Jednak wraz z rozwojem zwierząt populacja tych komórek zanika i jest zastępowana przez komórki o innym, niezidentyfikowanym pochodzeniu (Takashima i in., 2007). Wykazano również, że w szpiku kostnym rozwijającego się zarodka myszy można wyróżnić, co najmniej dwie populacje MSCs różniące się ekspresją białka nestyny i intensywnością podziałów komórkowych. Pierwszą z nich stanowią komórki pochodzące z mezodermy, niewykazujące ekspresji nestyny, charakteryzujące się intensywną

proliferacją i uczestniczące w procesie tworzenia szkieletu zarodka. Natomiast druga populacja to MSCs wywodzące się z komórek grzebienia nerwowego, prezentujące na powierzchni nestynę, niepodlegające podziałom, które pozostają bierne w trakcie formowania kości natomiast w dorosłym organizmie współtworzą niszę komórek hematopoetycznych (Isern i in., 2014). Wydaje się, więc że ontogeneza MSCs związana jest z komórkami należącymi do różnych listków zarodkowych a ich wyjściowe źródło determinuje rolę i funkcje, jaką pełnią one w dorosłym organizmie.

1.1.6. Nisza mezenchymalnych komórek macierzystych w dorosłym organizmie

W roku 1978 wprowadzone zostało pojęcie niszy, definiowanej, jako miejsce w organizmie, które jest zasiedlane przez komórki macierzyste i którego środowisko pozwala na podtrzymywanie ich w stanie niezróżnicowanym (Schofield, 1978). MSCs zostały po raz pierwszy pozyskane ze zrębu szpiku kostnego gdzie stanowią element komórek podścieliska, uczestnicząc w wytwarzaniu sygnałów modulujących dojrzewanie komórek hematopoetycznych. Jednak precyzyjna lokalizacja niszy dla MSCs nie została do tej pory poznana. W kontekście wyników badań wskazujących, że MSCs mogą być izolowane z wielu tkanek powstających z mezodermy podczas rozwoju zarodkowego poszukiwano elementu wspólnego dla wszystkich źródeł, z jakich MSCs mogą być izolowane i zaproponowano teorię o istnieniu ich niszy znajdującej się w obrębie naczyń krwionośnych, które są obecne we wszystkich strukturach, z których komórki te były izolowane.

Crisan i współpracownicy wykazali, że zasiedlające przestrzeń periwaskularną naczyń krwionośnych, izolowane z tkanek ludzkich takich jak mięśnie szkieletowe, trzustka, tkanka tłuszczowa i łożysko, komórki o fenotypie CD146⁺, NG2⁺ (neuroglikan-2; ang. neuroglycan-2), PDGF-Rβ⁺ (typ β receptora płytkopochodnego czynnika wzrostu; ang. β-type platelet-derived growth factor receptor), ALP⁺ niewykazujące ekspresji markerów komórek śródbłonna, hematopoetycznych i mięśniowych, opisywane, jako perycyty stanowiły prekursorzy dla hodowanych *in vitro* komórek spełniających kryteria warunkujące określenie ich mianem MSCs (Crisan i in., 2008). Otrzymana z wyizolowanych perycytów populacja komórek charakteryzowała się klonogennością, ekspresją białek CD44, CD73, CD90 i CD105 typowych dla MSCs, ponadto komórki te były zdolne do różnicowania w kierunku adipocytów, chondrocytów i osteoblastów (Crisan i in., 2008). Analogicznie do opisanych przez Friedensteina MSCs, komórki CD146⁺ zasiedlające przestrzeń periwaskularną sinusoid, czyli naczyń zatokowych szpiku kostnego są odpowiedzialne za wytwarzanie sygnałów pozwalających na odbudowę mikrośrodowiska szpiku kostnego po przeszczepie do heterotopowej lokalizacji (Sacchetti i in., 2007). Co więcej, śledzenie losów perycytów w procesie odbudowy uszkodzonego zęba u gryzoni pokazało, że przekształcają się one w odontoblasty, które powstają z komórek mezenchymalnych znajdujących się w miazdze zęba. Jednak te same badania wykazały, że w procesie odbudowy siekaczy u myszy przeważała ilościowo inna populacja odontoblastów, która nie powstaje z perycytów, lecz z migrujących do obszaru uszkodzenia komórek mezenchymalnych o innym pochodzeniu (Feng i in., 2011). Drugą populacją komórek, związaną z naczyniami krwionośnymi, proponowaną, jako odpowiednik MSCs w organizmie są komórki budujące przydanek o fenotypie CD34⁺ CD31⁻ CD146⁻, które po izolacji i hodowli *in vitro* spełniają kryteria definiujące populację jako MSCs. Jednak komórki te mają również zdolność do różnicowania się w perycyty (Zimmerlin i in., 2010; Corselli i in., 2012). Pomimo, że perycyty i MSCs posiadają bardzo podobny profil ekspresji genów, jak również zbliżoną zdolność do różnicowania (Covas i in., 2008; da Silva Meirelles i in., 2015), wykazano, że funkcje tych komórek są różne. Badania *in vitro* oddziaływań komórek śródbłonna we współ-hodowli z MSCs lub perycytami, pokazały, że jedynie perycyty są w stanie tworzyć z komórkami śródbłonna silnie rozgałęzione, zwarte, cylindryczne struktury o dużej średnicy, typowe dla dobrze zorganizowanych

naczyń krwionośnych, podczas gdy izolowane ze szpiku kostnego MSCs, nie mają takich zdolności. Aktualnie sądzi się, że istnieje powiązanie pomiędzy perycytami a MSCs jednak ich wzajemne relacje nie są dobrze sprecyzowane. Istnieją przypuszczenia, że MSCs stanowią formę pośrednią perycytów bądź ich subpopulację, jednak wciąż brak jest rozstrzygających dowodów potwierdzających tą hipotezę (Blocki i in., 2013; Caplan, 2008).

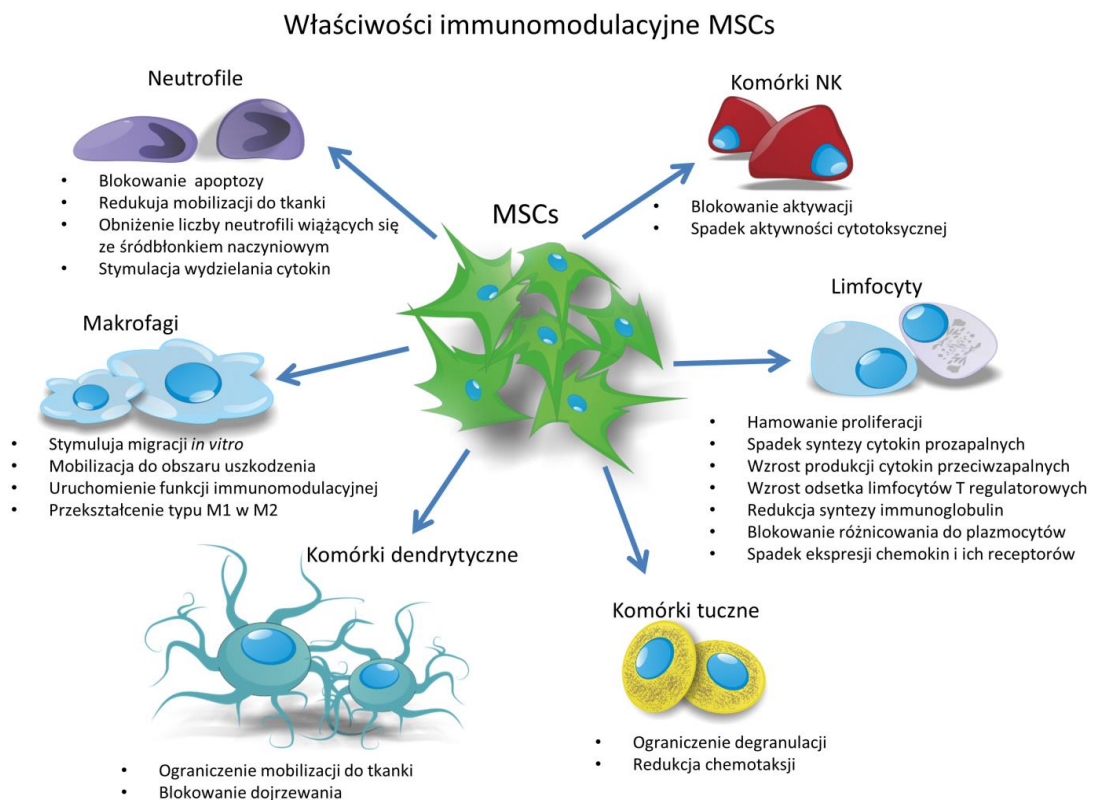
1.1.7. Immunogenność MSCs

W wielu doniesieniach literaturowych MSCs są często opisywane, jako komórki o niskiej immunogenności, co stanowi ich zaletę w kontekście zastosowania, jako potencjalnego materiału do transplantacji. Niska immunogenność komórek mezenchymalnych wynika z braku na powierzchni MSCs głównych antygenów układu zgodności tkankowej HLA II i cząsteczek ko-stymulatorowych (CD40, CD80, CD86) a także niskiej ekspresji antygenów HLA I (antygeny ludzkich leukocytów klasy I; ang. human leukocyte antigens class I), co utrudnia komórkom układu odpornościowego rozpoznanie MSCs i odpowiedź immunologiczną wobec nich (Oh, Kim, Yang i Lee, 2008; Dominici i in., 2006). Ponadto we współhodowlach w układzie allogenicznym MSCs nie indukują proliferacji limfocytów, co sugeruje, że nie wywołują ich aktywacji (Yañez i in., 2006). Jednak potwierdzenie statusu MSCs, jako komórek uprzywilejowanych immunologicznie pozostaje kwestią sporną. W literaturze można znaleźć doniesienia o aktywacji układu immunologicznego w odpowiedzi na przeszczepy MSCs w układach allogenicznym skutkujące odrzucaniem przeszczepu szpiku kostnego (Nauta i in., 2006), o obecności specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko MSCs w surowicy biorcy (Schu i in., 2012) jak również o przyspieszonym odrzucaniu kolejnych dawek komórek w porównaniu z przeszczepem pierwotnym. Zjawiska te wskazują na immunogenność przeszczepianych allogenicznie MSCs a ich przyczyn upatruje się w aktywacji limfocytów T przy udziale drogi pośredniej (poprzez prezentację antygenów dawcy przez APC (komórki prezentujące antygen; ang. antigen presenting cells) biorcy), w mechanizmach związanych z powstawaniem limfocytów T i B pamięci na skutek pre-sensytyzacji biorców alloantygenami przy transfuzji krwi, transplantacji narządów lub ciąży, jak również podatności MSCs na lizę przez aktywowane komórki NK (naturalne komórki cytotoksyczne; komórki naturalni zabójcy; ang. Natural Killers) i limfocyty Tc (limfocyty T cytotoksyczne; ang. cytotoxic T cell) (Consentius, Reinke i Volk, 2015; Griffin i in., 2013).

1.1.8. Właściwości immunomodulacyjne mezenchymalnych komórek macierzystych

Jedną z głównych zalet MSCs są ich właściwości immunomodulacyjne. MSCs hodowane w warunkach *in vitro* mają zdolność do oddziaływania i regulowania funkcji większości komórek efektorowych zaangażowanych w procesy pierwotnej i nabytej odpowiedzi immunologicznej (Krampera i in., 2013). Wywierają one swoje działanie immunomodulacyjne poprzez hamowanie indukowanej działaniem układu dopełniacza proliferacji komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (Tu, Li, Bu i Lin, 2010; Moll i in., 2011), blokują apoptozę natywnych i aktywowanych neutrofilii, jak również obniżają liczbę neutrofilii wiążących się z komórkami śródbłonna naczyń krwionośnych, redukując mobilizację tych komórek do obszaru uszkodzenia (Cassatella i in., 2011; Munir, Rainger, Nash i McGettrick, 2015). Ponadto syntetyzowane przez aktywowane MSCs cytokiny stymulują chemotaksję neutrofilii i wydzielanie przez nie pro-zapalnych chemokin zaangażowanych w rekrutację i pobudzenie właściwości żernych makrofagów (Brandau i in., 2014). MSCs ograniczają także degranulację komórek tucznych, wydzielanie przez te komórki cytokin prozapalnych, jak również ich migrację w kierunku czynnika chemotaktycznego (Brown i in., 2011). Natywne komórki MSCs mają zdolność blokowania proliferacji komórek NK indukowanej *de novo*, jednakże są one w stanie jedynie częściowo zahamować namnażanie już zaktywowanych komórek (Spaggiari i in., 2006). Przyczyniają

się także do zmniejszenia aktywności cytotoksycznej komórek NK (Spaggiari i in., 2008; Chatterjee i in., 2014). MSCs są zdolne do blokowania różnicowania izolowanych ze szpiku komórek CD34⁺, lub monocytów krwi w dojrzałe komórki dendrytyczne zarówno na drodze bezpośredniego kontaktu jak również poprzez wydzielane czynniki parakryne (Nauta i in., 2006; Jiang i in., 2005). Blokują one także przekształcanie się niedojrzałych komórek dendrytycznych w formy dojrzałe i ograniczają mobilizację komórek dendrytycznych do tkanki (Su i in., 2011). MSCs, a także nadsącz pochodzący z ich hodowli, stymulują migrację makrofagów *in vitro*, zwiększają ich mobilizację *in vivo* do obszaru gojącej się tkanki, przyspieszając proces jej odnowy (Chen, Tredget, Wu i Wu, 2008). Stymulują uruchomienie funkcji immunomodulacyjnej makrofagów. Pod ich wpływem makrofagi typu M1 (pro-zapalne) przekształcają się w komórki typu M2 o fenotypie przeciwzapalnym, a wydzielana przez nie IL-10 (IL; interleukina; ang. interleukin) hamuje proliferację limfocytów T (Chen i in., 2014; Gao i in., 2014).



Ryc. 1. Schemat przedstawiający wpływ wywierany przez MSCs na komórki układu immunologicznego

W badaniach *in vitro* wykazano bezpośredni wpływ immunomodulacyjny MSCs na limfocyty. Podczas współhodowli MSCs z limfocytami obserwowano zahamowanie proliferacji aktywowanych komórek T CD4⁺ i CD8⁺ oraz limfocytów B (Glennie i in., 2005). Ponadto MSCs zmniejszają poziom syntetyzowanych przez limfocyty T cytokin prozapalnych takich jak TNF- α (czynnik martwicy nowotworu α ; ang. tumor necrosis factor α) i IFN- γ (interferon γ) (Yañez i in., 2006), a zwiększają syntezę cytokin przeciwzapalnych np. IL-4. W obecności MSCs obserwowano zahamowanie różnicowania naiwnych limfocytów T CD4⁺ do limfocytów Th17⁺ (Th; Limfocyty T pomocnicze; ang. T helper cells) wzrastał natomiast odsetek limfocytów T różnicujących się w kierunku limfocytów T

regulatorowych CD4⁺CD25⁺ (Ghannam i in., 2010; Aggarwal i Pittenger, 2005). Glennie i wsp określili ten stan, jako anergię, w którą wchodzi aktywowane limfocyty T w obecności MSCs (Glennie i in., 2005). Komórki MSCs mają także zdolność do ograniczania syntezy immunoglobulin klas IgM, IgG i IgA (Ig; immunoglobulina; ang. immunoglobulin) wydzielanych przez aktywowane limfocyty B, tym samym blokując różnicowanie tych komórek do plazmacytów. Zmniejszają również ekspresję chemokin i ich receptorów na powierzchni limfocytów B, poprzez co prawdopodobnie negatywnie wpływają na zdolność tych komórek do migracji (Corcione i in., 2006).

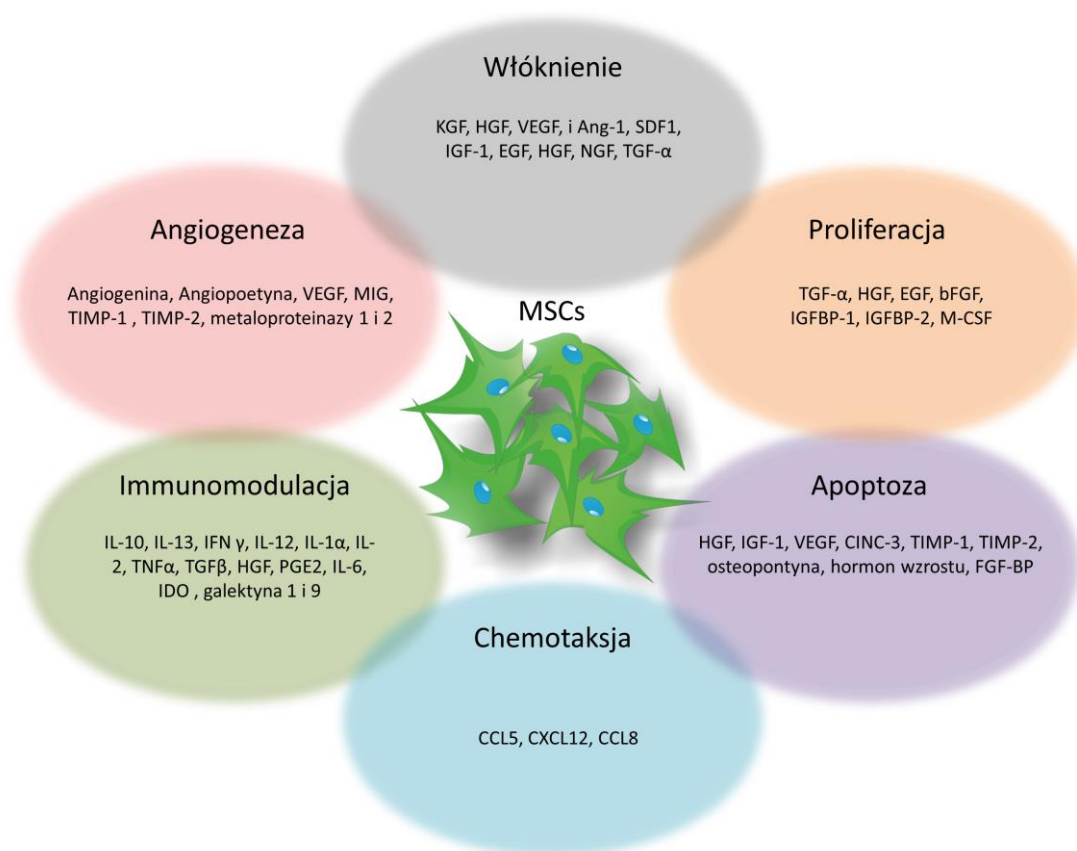
1.1.9. Właściwości parakryne mezenchymalnych komórek macierzystych

Mezenchymalne komórki macierzyste wydzielają szeroką gamę czynników o działaniu parakrynnym i autokrynnym, wspólnie określanym mianem sekretomu, które wspierają procesy regeneracyjne w uszkodzonej tkance. Wśród nich możemy wyróżnić składniki macierzy zewnątrzkomórkowej i białka zaangażowane w proces adhezji, enzymy jak również ich aktywatory i inhibitory, czynniki wzrostu i białka je wiążące, cytokiny oraz chemokiny (Kupcova Skalnikova, 2013). Czynniki te można również podzielić pod względem ich wpływu na procesy, jakie regulują. Wśród czynników wydzielanych przez MSCs wyróżniamy czynniki promujące angiogenezę, takie jak: Angiogenina, Angiopoetyna czy czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF; ang. vascular endothelial growth factor) oraz takie, które ten proces hamują w tym MIG (monokina indukowana przez interferon γ ; ang. monokine induced by interferon γ) oraz tkankowe inhibitory metaloproteinaz 1 i 2 (TIMP-1 - tkankowy inhibitor metaloproteinaz 1; ang. tissue inhibitor of metalloproteinases 1, TIMP-2 - tkankowy inhibitor metaloproteinaz 2; ang. tissue inhibitor of metalloproteinases 2) (Cantiniaux i in., 2013; Zanotti i in., 2016). Inną grupę stanowią czynniki immunomodulujące, w tym cytokiny o działaniu przeciwzapalnym takie, jak: IL-10 oraz IL-13, jak również pro-zapalnym, wśród których warto wymienić IFN γ , IL-12, IL-1 α , IL-2 czy TNF α . Do istotnych immunomodulatorów wydzielanych przez MSCs zalicza się również TGF β (transformujący czynnik wzrostu β ; ang. transforming growth factor β), HGF (czynnik wzrostu hepatocytów; ang. hepatocyte growth factor), PGE2 (prostaglandyna E2; ang. prostaglandin E2), IL-6,IDO (2,3 dioksygenaza indoloaminy; ang. indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase), galektyny 1 i 9 oraz tlenek azotu produkowany na skutek wzrostu ekspresji syntazy tlenku azotu (Di Nicola i in., 2002; Kuçi i in., 2013; Nasef i in., 2007; Ling i in., 2014; Mougiakakos i in., 2011; Gieseke i in., 2010; Ungerer i in., 2014). Istotną rolę odgrywają też wydzielane przez MSCs chemokiny pośredniczące w procesie blokowania bądź stymulacji chemotaksji komórek takie jak: CCL5 (RANTES; czynnik regulowany przez aktywację limfocytów T; ang. regulation on activation normal T-cells expressed and secreted), CXCL12 (SDF-1; czynnik podścieliska-1; ang. stromal cell-derived factor 1) czy CCL8 (MCP-2; białko chemotaktyczne dla monocytów-2; ang. monocyte chemoattractant protein 2). Ważną grupę czynników z punktu widzenia procesów regeneracji stanowią czynniki wzrostu o działaniu anty-apoptycznym w tym: HGF, IGF-1 (insulinopodobny czynnik wzrostu 1; ang. insulin-like growth factor 1), VEGF, CINC-3 (cytokina indukowana chemoatraktantem dla neutrofilii; ang. cytokine-induced neutrophil chemoattractant), TIMP-1, TIMP-2, osteopontyna, hormon wzrostu, FGF-BP (białko wiążące bFGF; ang. FGF-Binding Protein) i BDNF (czynnik wzrostu pochodzenia mózgowego; ang. brain-derived neurotrophic factor) oraz stymulujące proliferację jak: TGF- α (transformujący czynnik wzrostu α ; ang. transforming growth factor α), HGF, EGF (nabłonkowy czynnik wzrostu; ang. epidermal growth factor), NGF (czynnik wzrostu nerwów; ang. nerve growth factor), bFGF (zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów; ang. basic fibroblast growth factor), IGFBP-1, IGFBP-2 (IGFBP; białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu 1; ang. ang. IGF -Binding Protein-1) i M-CSF (czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów; ang.

macrophage colony-stimulating factor) (Eliopoulos i in., 2010; Cantinieaux i in., 2013; Eom, Shim i Baik, 2015). Czynnikiem wzrostu wydzielanym przez MSCs przypisywana jest również zdolność do ograniczenia włóknienia tkanek w trakcie regeneracji. Wśród nich wymieniane są: KGF (czynnik wzrostu keratynocytów; ang. keratinocyte growth factor), HGF, VEGF, i Ang-1 (angiopoetyna-1; ang. angiopoietin-1), SDF1, IGF-1, EGF, HGF, NGF, TGF- α (Álvarez, Levine i Rojas, 2015; Eom, Shim i Baik, 2015). Interesujące są także doniesienia o oddziaływaniach sekretom MSCs z komórkami nowotworowymi i jego właściwościach przeciwbakteryjnych. Dane dotyczące wpływu MSCs na nowotworzenie nie są jednoznaczne, jednak przypuszcza się, że duże znaczenie dla ostatecznego efektu ma zarówno typ nowotworu jak i źródło pochodzenia MSCs (Vizoso i in., 2017). Badania Attar-Schneider i współpracowników wykazały, że czynniki zawarte w sekretomie MSCs są w stanie zmniejszyć proliferację, żywotność i migrację niektórych typów komórek nowotworowych (jak np. niedrobnokomórkowego raka płuc) (Attar-Schneider, Zismanov, Drucker i Gottfried, 2016). Z kolei wyniki innych autorów pokazały, że czynniki uwalniane przez MSCs mogą zwiększać ruchliwość, inwazyjność i zdolność do tworzenia przerzutów (w tym np. komórek raka piersi) (Karnoub i in., 2007). W odpowiedzi na kontakt z bakteriami poziom cytokin takich, jak: IL-6, IL-8, CCL5, PGE2, TNF- α , IL-1 β , IL-10, VEGF oraz SDF-1 wydzielanych przez MSCs podlega zmianom (Mezey i Nemeth, 2015). Badania pokazują, że sekretom MSCs zawiera substancje o działaniu przeciwbakteryjnym, przeciwpasożytniczym i przeciwwirusowym (Meisel i in., 2011).

Kolejnym szerokim i dynamicznie rozwijającym się na przestrzeni ostatnich lat zagadnieniem związanym z aktywnością parakrynną MSCs jest ich zdolność do uwalniania zewnątrzkomórkowych pęcherzyków, do których zaliczane są egzosomy, mikropęcherzyki i pęcherzyki apoptotyczne. Ich skład w znacznym stopniu pokrywa się z komponentami zawartymi w komórkach, od których się wywodzą. Fizjologicznie odgrywają one istotną rolę w regulacji funkcji biologicznych, homeostazy i odpowiedzi immunologicznej organizmu. Postuluje się również, że aktywność biologiczna mikropęcherzyków jest porównywalna do działania MSCs (Koniusz i in., 2016). Eksperymenty prowadzone z wykorzystaniem nadsącza pochodzącego z hodowli MSCs *in vitro* pokazały, że czynniki zawarte w sekretomie są odpowiedzialne za dużą część efektów wywieranych przez MSCs podczas regeneracji uszkodzonego obszaru włączając w to ochronę innych komórek przed apoptozą, indukcję ich proliferacji, zapobieganie nadmiernemu włóknieniu tkanek, stymulację procesu angiogenezy i działanie immunomodulacyjne, jak również indukcję różnicowania endogennie występujących w organizmie komórek macierzystych (Patel i in., 2010; Maggini i in., 2010; Aggarwal i Pittenger, 2005; Djouad i in.,

2007; Li i in., 2015a; Tang i in., 2005; Zanotti i in., 2016; Bronckaers i in., 2014; Kinnaird i in., 2004; Dai i in., 2005; Chen i in., 2003; Caplan i Dennis, 2006).



Ryc. 2. Na schemacie wymieniono regulowane przez MSCs procesy zachodzące podczas regeneracji tkanek. W elipsach podano wybrane czynniki zaliczane do sekretomu MSCs modulujące poszczególne z wymienionych zjawisk.

1.1.10. Zdolność mezenchymalnych komórek macierzystych do różnicowania

Wśród cech określających charakterystykę MSCs, wytyczonych przez Międzynarodowe Towarzystwo Terapii Komórkowej w 2006 roku, znajduje się zdolność do różnicowania w trzy typy komórek takie jak: osteoblasty, chondrocyty i adipocyty (Dominici i in., 2006). Jednak wiele doniesień literaturowych wskazuje, że poprzez działanie odpowiednimi czynnikami z MSCs można uzyskać także inne komórki. Caplan i Dennis w swojej pracy z roku 2006 przedstawiają proces, który określają mianem mezogenezy (w oryginale ang. mesengenesis), w którym MSCs dają początek nie tylko osteoblastom, chondrocytom i adipocytom, ale również mioblastom, komórkom zrębu szpiku kostnego, fibroblastom, komórkom współtworzącym tkankę łączną organizmu jak również więzadła i ścięgna (Caplan i Dennis, 2006). Jednak najlepiej poznanym z tych procesów jest przekształcenie MSCs w komórki pochodzące z mezodermy, czyli tak jak wspomniano powyżej w adipocyty (Dennis i in., 1999), chondroblasty (Yoo i in., 1998) i osteoblasty (Haynesworth, Goshima, Goldberg i Caplan, 1992). Proces ten można prześledzić *in vitro* umieszczając MSCs w pożywce zawierającej specyficzne suplementy, dla procesu adipogenezy są to głównie deksametazon, indometacyna, insulina i izobutylometyloksantyna (Rosen i MacDougald, 2006), dla chondrogeny hodowla komórek w pożywce DMEM (pożywka hodowlana;

ang. Dulbecco/Vogt Modified Eagle's Minimal Essential Medium) uzupełnionej insuliną, transferyną, selenem, kwasem linolowym, kwasem selenowym, pirogronianem, fosforanem askorbinowym, deksametazonem i TGF- β III (Mackay i in., 1998), która ponadto może być wspomagana dodatkiem IGF-1 i BMP-2 (BMP; białka morfogenetyczne kości; ang. bone morphogenetic proteins) (An, Cheng, Yuan i Li, 2010), z kolei proces osteogenezy jest indukowany obecnością kwasu askorbinowego, β -glicerofosforanu i deksametazonu (Pittenger i in., 1999). Różnicowanie MSCs w odpowiedni typ komórek ocenia się poprzez identyfikację wytworzenia odpowiednio: kropel tłuszczu, syntezę proteoglikanów i kolagenu typu II lub mineralizację złogów wapnia oraz wzrost ekspresji fosfatazy zasadowej. Dodanie do MSCs 5-azacytydyny pozwala uzyskać komórki mięśniowe w tym kardiomiocyty i mioblasty mające zdolność do współtworzenia wielojądrowych miotub i charakteryzujące się ekspresją markerów takich jak: ciężkie łańcuchy β -miozyny, sercowa forma α -aktyny i desmina (Xu i in., 2004). Ponadto badania *in vitro* pozwoliły na uzyskanie z MSCs, co najmniej dwóch typów komórek wywodzących się z endodermy, na drodze ich transdyferencji do hepatocytów i komórek β wysp trzustki. Pozyskanie z MSCs komórek wątroby odbywa się dwuetapowo poprzez ich hodowlę w zmodyfikowanej pożywce Dulbecco uzupełnionej o EGF, bFGF i nikotynamid, a w kolejnym etapie z dodatkiem onkostatyny M, deksametazonu, insuliny, transferyny i selenu. Tak powstałe komórki wykazują obecność markerów typowych dla hepatocytów takich jak albumina, α -fetoproteina i jądrowy czynnik hepatocytów 4 α (HNF-4 α ; ang. hepatocyte nuclear factor 4 α) (Lee i in., 2004). Przy zastosowaniu mieszaniny czynników wzrostu wydzielanych przez regenerujące komórki trzustki jak również z wykorzystaniem acetywiny A, maślanu sodu, tauryny i nikotynamidu z MSCs uzyskano komórki wysp trzustki typu β zdolne do wytwarzania insuliny (Phadnis i in., 2011; Govindasamy i in., 2011). Wykazano również, że stymulacja odpowiednimi czynnikami, może spowodować różnicowanie MSCs w komórki wywodzące się ontogenetycznie z ektodermy, takie jak neurony. Zastosowanie w hodowli *in vitro* stymulacji przy użyciu BME (β -merkaptoetanol), a następnie NGF prowadzi do różnicowania MSCs w cholinergiczne komórki nerwowe wykazujące ekspresję białek dla nich typowych takich jak neurofilamenty NF-68 (białko neurofilamentów o masie molekularnej 68 kDa; ang. 68 kDa neurofilament protein), NF-200 (białko neurofilamentów o masie molekularnej 200 kDa; ang. 200 kDa neurofilament protein), NF-160 (białko neurofilamentów o masie molekularnej 160 kDa; ang. 160 kDa neurofilament protein), acetylotransferaza cholinowa i synapsyna I (Naghdi, Tiraihi, Namin i Arabkheradmand, 2009). Innymi czynnikami wymienianymi, jako związki indukujące przekształcenie MSCs do komórek nerwowych są insulina, kwas retinowy, bFGF, EGF, kwas walproinowy, BME i hydrokortyzol (Anghileri i in., 2008). Ponadto działanie GDNF (czynnik wzrostu pochodzenia glejowego; ang. glial cell-derived neurotrophic factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factors), kwasem retinowym, 5-azacytydyną, izobutylometyloksantyną i indometacyną stymuluje przekształcenie MSCs w dojrzałe neurony, które wykazują ekspresję markerów komórek nerwowych takich jak: nestyna, tubulina β -III, białko towarzyszące mikrotubulom - MAP2 (białko stabilizujące mikrotubule; ang. microtubule associated protein 2) i enolazę swoistą dla neuronów (ENO2; ang. enolase 2) (Pavlova i in., 2012). Badania te pokazują, że w ściśle kontrolowanych warunkach panujących podczas hodowli *in vitro*, w obecności substancji chemicznych i czynników wzrostu MSCs są w stanie przekształcić się w komórki wywodzące się ze wszystkich trzech listów zarodkowych.

1.2. Eksperymentalne próby wykorzystania mezenchymalnych komórek macierzystych w leczeniu chorób układu nerwowego

Terapia komórkowa z wykorzystaniem mezenchymalnych komórek macierzystych jest aktualnie jednym z najbardziej pręźnie rozwijających się działów medycyny regeneracyjnej. Łatwość pozyskiwania MSCs z różnych źródeł, ich niska immunogenność i zdolności immunomodulacyjne sprawiają, iż mogą być one przeszczepiane nie tylko w układzie auto-, ale również allogenicznym. Ponadto właściwości anty-apoptotyczne, parakryne i wielokierunkowa zdolność MSCs do różnicowania sprawia, że są one aktualnie oceniane w próbach eksperymentalnych i klinicznych leczenia najczęściej występujących chorób, w tym chorób neurologicznych obejmujących struktury ośrodkowego układu nerwowego (OUN; ang. central nervous system), dla których brak jest skutecznych alternatywnych metod leczenia, takich jak: udar mózgu, choroba Alzheimer, stwardnienie zanikowe boczne, choroba Huntingtona, Parkinsona, stwardnienie rozsiane czy uszkodzenie rdzenia kręgowego.

1.2.1. Udar mózgu

Udar mózgu przejawia się w postaci nagle występujących deficytów neurologicznych pojawiających się w wyniku zaburzeń krążenia mózgowego. Ze względu na mechanizm patogenezy wyróżnia się udar niedokrwienny powstający na skutek zamknięcia światła jednego z naczyń krwionośnych doprowadzających krew do mózgu spowodowanego zakrzepem bądź zatorom oraz udar krwotoczny, którego przyczyną jest krwotok. Najczęściej występującym rodzajem jest udar niedokrwienny, w wyniku, którego obszary mózgu, w których są niedrożne naczynia krwionośne podlegają niedotlenieniu, dochodzi do powstania strefy martwicy otoczonej przez penumbę – nazywaną również strefą półcienia, w której metabolizm tlenowy tkanki podlega spowolnieniu, jednak nie dochodzi do powstania nekrozy, a uzyskanie reperfuzji tej strefy w krótkim czasie od wystąpienia niedokrwienia może potencjalnie przywrócić normalną funkcję komórek. W zależności od obszaru objętego udarem mogą wystąpić różne jego objawy takie jak utrata świadomości i śpiączka, demencja, zaburzenia widzenia, czucia, mowy, niedowład nerwu twarzowego, kończyn dolnych oraz górnych. Stopień nasilenia niepełnosprawności u osób po udarze może być łagodny powodując jedynie nieznaczne obniżenie sprawności ruchowej, ale może również prowadzić do ciężkiego upośledzenia, gdzie pacjent wymaga stałej pomocy. Jedyną aktualnie zatwierdzoną farmakologiczną metodą leczenia udaru niedokrwiennego mózgu jest dożylnie podawanie chorym tkankowego aktywatora plazminogenu, mające na celu rozpuszczenie zakrzepu powodującego niedrożność naczynia krwionośnego. Jednak ze względu na bardzo wąskie okno terapeutyczne dla przeprowadzenia tego zabiegu, mieszczące się w zakresie do 4.5 godziny od pojawienia się objawów udaru, możliwość jego zastosowania jest ograniczona do niewielkiego odsetka chorych (około 15 % pacjentów). W ciągu ostatnich lat obserwujemy pojawianie się dużej liczby prac pokazujących wysoką skuteczność mechanicznego usunięcia skrzepu drogą przętętniczą przy znacznym wydłużeniu okna terapeutycznego obejmującego w niektórych przypadkach nawet okres do 24 godzin (Bhaskar i in., 2018). Jednak u niektórych pacjentów pomimo zabiegu wciąż dochodzi do udaru mózgu, choć ma on zdecydowanie łagodniejszy przebieg. W wielu ośrodkach trombektomia jest już uznana za standardowe leczenie udaru mózgu, jednak jej przeprowadzenie wymaga specjalistycznego sprzętu i wysokiej klasy specjalistów. W związku, z czym w większości krajów świata dostępność tego leczenia pozostaje niska. Aktualnie w Polsce terapia ta nie jest refundowana przez narodowy fundusz zdrowia (Bhaskar i in., 2018). Terapia komórkowa z zastosowaniem MSCs była stosowana w różnych modelach eksperymentalnych udaru mózgu u zwierząt. Mezenchymalne komórki macierzyste były podawane poprzez iniekcję dożylną lub domózgowo. Po transplantacji MSCs obserwowano zmniejszenie obrzęku mózgu i obszaru lezji oraz poprawę funkcji motorycznych zwierząt (Honma i in., 2006; Horita i in.,

2006). Wśród wymienianych mechanizmów działania przeszczepionych komórek autorzy sugerują stymulację procesu angiogenezy, ochronę integralności bariery krew-mózg i obniżenie apoptozy komórek w obszarze uszkodzenia mózgu (Onda i in., 2008; Tang i in., 2014) oraz wzmożenie proliferacji komórek progenitorowych warstwy podkomorowej komór bocznych i oligodendrocytów, co skutkuje intensyfikacją procesu synaptogenezy i remielinizacją aksonów (Shen i in., 2006). Ponadto obserwowano immunomodulacyjne działanie podanych MSCs, wzrost stężenia cytokin przeciwzapalnych takich jak IL-10 (Li i in., 2010a) oraz obniżenie nadmiernej aktywacji mikrogleju (Wei i in., 2012). Jeden z pierwszych eksperymentów klinicznych, w którym dożylnie podano autologiczne MSCs szpiku kostnego pacjentom z udarem niedokrwinnym został przeprowadzony w bardzo małej grupie pięciu chorych. Autorzy wykazali niewielką poprawę funkcjonalną u wszystkich osób poddanych zabiegowi w ciągu pierwszego roku od transplantacji (Bang, Lee, Lee i Lee, 2005). Późniejsze badania kliniczne przeprowadzone w większej grupie pacjentów potwierdziły te obserwacje. Szczególnie warte podkreślenia jest znaczące zmniejszenie śmiertelności w okresie 5 lat po udarze w porównaniu do pacjentów, którzy nie otrzymali przeszczepu. Dodatkowo, badania te pokazały, że najlepszą odpowiedź na podanie MSCs uzyskiwano u osób, u których obszar pierwotnego uszkodzenia mózgu powstałego na skutek udaru nie obejmował strefy SVZ. Pośrednio może to świadczyć o tym, że poprawa funkcjonalna u pacjentów jest wynikiem stymulacji procesu neurogenezy przez egzogenne MSCs. Takie obserwacje były opisane podczas badań eksperymentalnych u zwierząt (Lee i in., 2010b). W innym badaniu klinicznym przeprowadzonym w roku 2011 poza poprawą funkcjonalną u pacjentów już po 7 dniach od podania MSCs obserwowano redukcję wielkości lezji poudarowej, o co najmniej 15 % wartości wyjściowej. Stopień zmniejszenia obszaru uszkodzenia korelował z poprawą funkcjonalną obserwowaną u chorych (Honmou i in., 2011).

1.2.2. Choroba Alzheimerera

Choroba Alzheimerera jest postępującą przewlekłą chorobą neurodegeneracyjną, która przejawia się w postaci postępującej demencji skutkującej ograniczeniem funkcji poznawczych i przedwczesną śmiercią. U chorych w obrazie histologicznym mózgu widoczna jest akumulacja płytek amyloidu β jak również obecność zwyrodnienia neurofibrilarnego w cytoplazmie neuronów, które ulegają wzmożonej śmierci komórkowej. W badaniach eksperymentalnych na modelach zwierzęcych choroby Alzheimerera podejmowano próby zahamowania rozwoju schorzenia poprzez podawanie MSCs drogą dożylną, domózgową lub dokomorową. Wyniki badań okazały się obiecujące. Po transplantacji MSCs dochodziło do zmniejszenia liczby obecnych w mózgu zwierząt depozytów amyloidu β , obserwowano przywrócenie aktywności żernej mikrogleju, którego funkcjonowanie jest podczas choroby upośledzone. W mózgu myszy objętych zmianami wynikającymi z choroby stwierdzono ograniczenie liczby obumierających komórek głównie w rejonie hipokampa, wzrost stabilności połączeń synaptycznych, stymulację procesu neurogenezy w strefie przykomorowej i podziarnistej oraz wzmożenie różnicowania neuralnych komórek macierzystych do neuronów. Podanie MSCs spowodowało opóźnienie pojawienia się objawów chorobowych u myszy, u których MSCs były przeszczepiane we wczesnej fazie choroby. Zauważono, że transplantacja MSCs w późniejszej fazie choroby łagodziła problemy związane z pamięcią i zdolnościami poznawczymi zwierząt (Lee i in., 2010a; Kim i in., 2012; Yan i in., 2014; Oh i in., 2015). Dotychczasowe próby kliniczne przeszczepiania MSCs u pacjentów z chorobą Alzheimerera pokazały, że dożylne podanie komórek było bezpieczne, u chorych nie zanotowano niepożądanych efektów ubocznych, nie obserwowano jednak jakiegokolwiek poprawy stanu klinicznego (Kang, Yeon, Cho i Suh, 2016).

1.2.3. Stwardnienie zanikowe boczne

Stwardnienie zanikowe boczne jest chorobą o dotychczas niewyjaśnionej etiologii, która najczęściej pojawia się sporadycznie i kończy się śmiercią pacjenta zazwyczaj w ciągu kilku lat od zidentyfikowania pierwszych objawów. Podczas choroby dochodzi do stopniowego zaniku neuronów kory ruchowej mózgu oraz motoneuronów pnia mózgu i rdzenia kręgowego. W końcowej fazie schorzenia następuje paraliż mięśni oddechowych, co najczęściej stanowi bezpośrednią przyczynę zgonu. W eksperymentalnym modelu stwardnienia zanikowego bocznego u myszy, którym podawano MSCs obserwowano stymulację regeneracji tkanki nerwowej i neuroprotekcję. U zwierząt poddanych transplantacji MSCs opisano spowolnienie procesu degeneracji motoneuronów, redukcję liczby komórek objętych śmiercią komórkową, poprawę stanu mitochondriów i funkcji neuromotorycznych biorców. Objawy choroby pojawiały się później a czas życia zwierząt był dłuższy w porównaniu do zwierząt, które nie otrzymały przeszczepu. Autorzy prac wskazują, że obserwowane efekty są najprawdopodobniej związane z neuroprotektynym działaniem czynników wydzielanych przez przeszczepione MSCs takich jak: NGF, BDNF, IGF-1 i VEGF (Corti i in., 2010; Kim i in., 2014; Jeon i in., 2016). Badania kliniczne przeprowadzone u pacjentów, którym podano MSCs wykazały, że podobnie jak u zwierząt eksperymentalnych, u chorych obserwowano spowolnienie progresji schorzenia. W jednym z przeprowadzonych eksperymentów medycznych podanie MSCs nie miało wpływu na stan pacjentów jednak ocena u tych chorych wykonana post-mortem wykazała, że na wysokości obszaru rdzenia kręgowego gdzie podawane były komórki zachowana została większa liczba motoneuronów w porównaniu do innych miejsc w rdzeniu (Blanquer i in., 2012; Rushkevich i in., 2015; Syková i in., 2017).

1.2.4. Choroba Huntingtona

Choroba powstaje na skutek mutacji w genie kodującym białko o nazwie huntingtyna, które w nadmiernych ilościach akumuluje się w komórkach i ma działanie cytotoksyczne. Podczas choroby Huntingtona dochodzi do obumierania neuronów mózgu, szczególnie narażone są neurony zlokalizowane w obrębie struktur prążkowiec takie jak jądro ogoniaste i skorupa, wydzielające kwas γ -aminomasłowy (GABA; ang. gamma-aminobutyric acid). Objawy choroby pojawiają się zwykle około 30-40 roku życia i są związane z zaburzeniami funkcji motorycznych, zachowania i zdolności poznawczych. W przypadku większości prowadzonych dotychczas badań transplantacji MSCs w chorobie Huntingtona komórki były podawane domózgowo. U zwierząt w modelach eksperymentalnych choroby Huntingtona, którym przeszczepiano MSCs obserwowano ograniczenie ilości agregatów huntingtyny, zmniejszenie liczby komórek apoptotycznych w rejonie prążkowiec oraz ograniczenie atrofii mózgu wraz z towarzyszącym temu zmniejszeniem, zazwyczaj poszerzonych w przebiegu choroby komór bocznym mózgu. Uzyskiwano również lepsze wyniki oceny funkcji motorycznych zwierząt, spowolnienie rozwoju choroby i wydłużenie czasu przeżycia u biorców MSCs (Rossignol i in., 2011; Lee i in., 2009; Fink i in., 2013).

1.2.5. Choroba Parkinsona

Postępująca degeneracja produkujących dopaminę neuronów występujących w obrębie istoty czarnej mózgu prowadzi do rozwoju choroby Parkinsona. Do głównych objawów schorzenia zalicza się drżenie spoczynkowe, sztywność mięśni, bradykinezę, problemy z zachowaniem postawy i ograniczoną zdolność do kontrolowania precyzyjnych ruchów, ponadto dochodzi do upośledzenia funkcji poznawczych, zaburzeń snu i węchu. Aktualnie czynniki wywołujące chorobę nie są znane, w większości przypadków rozwija się ona spontanicznie, jednak u około 5 % pacjentów obserwuje się występowanie mutacji w genie kodującym α -synucleinę, co jest związane z powstawaniem agregatów białkowych w ciałach neuronów nazywanych ciałami Lewy'ego, które mają działanie cytotoksyczne. U

zwierząt w modelu choroby Parkinsona podanie MSCs odbywało się głównie na drodze domózgowej, ale podejmowano również próby podań drogą dożylną, dotętniczną oraz donosowo. Transplantacja mezenchymalnych komórek macierzystych skutkowała zachowaniem większej liczby neuronów dopaminergicznych w mózgu, jak również komórek nerwowych wykazujących ekspresję enzymu hydroksylazy tyrozynowej katalizującej reakcje prowadzące do produkcji dopaminy, co powodowało wzrost ilości tego neuroprzekaźnika w obrębie prążkowie. Obserwowano zwiększoną neurogenezę w strefie podkomorowej mózgu. Badania behawioralne pokazały, że podanie MSCs poprawiało pamięć i funkcje motoryczne zwierząt (Ren i in., 2013; Schwerk i in., 2015; Salama i in., 2017). W badaniach klinicznych u pacjentów z chorobą Parkinsona domózgowe podanie MSCs prowadziło do polepszenia ogólnego stanu klinicznego co manifestowało się poprawą wyrazu twarzy i chodu. U chorych, którym przeszczepiano MSCs do tętnicy mózgowej dochodziło do stabilizacji funkcji motorycznych w ciągu kolejnego roku od transplantacji (Venkataramana i in., 2010; Canesi i in., 2016).

1.2.6. Stwardnienie rozsiane

Kolejną z postępujących chorób neurodegeneracyjnych o podłożu autoimmunologicznym jest stwardnienie rozsiane. Patofizjologia schorzenia związana jest z powstaniem w organizmie autoreaktywnych limfocytów i komórek prezentujących antygeny. Cytokiny prozapalne produkowane przez te komórki sprzyjają rekrutacji elementów układu odpornościowego takich jak: makrofagi, komórki tuczne, neutrofile i limfocyty do struktur ośrodkowego układu nerwowego, gdzie niszczą one osłonki mielinowe i aksony neuronów. Skutkuje to powstaniem wieloogniskowych zmian degeneracyjnych widocznych w postaci plaków stwardnieniowych – obszarów demielinizacji i masywną utratą neuronów. Obraz kliniczny pacjenta chorego na stwardnienie rozsiane jest w dużym stopniu zależny od lokalizacji zmian jednak zazwyczaj występuje niedowład, zaburzenia widzenia, czucia, mowy, równowagi i koordynacji a także problemy z pamięcią i ograniczenie procesów poznawczych. W zwierzęcym modelu choroby - eksperymentalnym alergicznym zapaleniu mózgu i rdzenia (EAE; ang. experimental autoimmune encephalomyelitis), systemowe podanie MSCs indukuje wytworzenie tolerancji u biorcy przeszczepu na własne antygeny. W obszarze rdzenia kręgowego u zwierząt poddanych transplantacji MSCs obserwowano wzmoczenie oligodendrogeny, ograniczenie astroglejozy i silniejszą niż u zwierząt kontrolnych remielinizację (Bai i in., 2009). Skutkuje to znacznie łagodniejszym przebiegiem choroby z mniejszą częstością nawrotów i redukcją liczby nacieków komórek układu immunologicznego oraz ograniczeniem demielinizacji i utraty aksonów (Zappia i in., 2005; Gerdoni i in., 2007). Niemniej jednak w literaturze możemy odnaleźć prace wskazujące na to, że przeszczep MSCs może mieć negatywne skutki. Transplantacja mezenchymalnych komórek macierzystych może wpływać na aktywację subpopulacji limfocytów CD8⁺ powodując ich degranulację oraz wzmoczenie wydzielania substancji o właściwościach cytotoksycznych takich, jak: INF- γ oraz granzym B, co prowadzi do zaostrzenia przebiegu choroby (Glenn, Smith, Calabresi i Whartenby, 2014). Badania kliniczne z udziałem MSCs podawanych chorym do kanału rdzenia kręgowego lub przeszczepianych dożylnie pokazały, że u pacjentów obserwowano zmniejszenie liczby obszarów lezji widocznych w obrazowaniu MRI a w niektórych przypadkach stabilizację oraz poprawę oceny neurologicznej (Karussis i in., 2010; Llufriu i in., 2014). W badaniu, które obejmowało pacjentów z zaburzeniami widzenia, po podaniu MSCs obserwowano poprawę ostrości wzroku (Connick i in., 2012).

1.2.7. Uszkodzenie rdzenia kręgowego

Mechaniczne, powypadkowe uszkodzenie rdzenia kręgowego prowadzi do przerywania nerwowych dróg ruchowych i czuciowych skutkując trwałą niepełnosprawnością, co ma znaczący wpływ, na jakość życia chorych. Do pierwotnych patologicznych zmian powstałych po uszkodzeniu rdzenia zalicza się

przerwanie ciągłości aksonów i naczyń krwionośnych, jednak zmiany pojawiające się wtórnie takie, jak zaburzenie lokalnych stężeń jonowych, utrata regulacji ciśnienia krwi, zmniejszony przepływ krwi przez rdzeń kręgowy, przerwanie bariery krew-mózg, aktywacja komórek odpowiedzi immunologicznej, apoptoza komórek i ekscytotoksyczność prowadzą do pogorszenia się stanu pacjentów i mają negatywny wpływ na proces regeneracji. Zahamowanie tych procesów może stanowić potencjalny cel zastosowania terapii z wykorzystaniem przeszczepów komórek macierzystych. W większości prób eksperymentalnych podanie MSCs w zwierzęcych modelach uszkodzenia rdzenia kręgowego odbywa się poprzez bezpośrednią ich iniekcję do obszaru lezji. Po transplantacji MSCs obserwowano wzmocnienie angiogenezy, proliferacji oligodendrocytów, regeneracji i remielinizacji aksonów, ograniczenie włóknienia i redukcję wielkości lezji pouszkodzeniowej. Ponadto podanie MSCs miało efekt przeciwzapalny, co przejawiało się spadkiem ilości cytokin, aktywowanych makrofagów, komórek mikrogleju i astrocytów. Odnotowano ogólną poprawę funkcji motorycznych i czuciowych u biorców przeszczepu (Zhou i in., 2013; Gu i in., 2010; Ryu i in., 2009). Pierwsze z podjętych pilotażowych prób zastosowania MSCs w leczeniu powypadkowego, niecałkowitego i całkowitego przerwania rdzenia kręgowego u ludzi przyniosły pozytywne rezultaty. Stopień odpowiedzi poszczególnych pacjentów na podanie MSCs był zróżnicowany, jednak u większości z nich obserwowano polepszenie obrazu klinicznego. Transplantacja komórek korzystnie wpływała na funkcje czuciowe i ruchowe, włączając poprawę ruchliwości kończyn górnych oraz czucia w obrębie uszkodzonego obszaru u tetraplegików, potwierdzoną również badaniami neurofizjologicznymi. Ponadto obserwowano poprawę w ocenie całkowitego funkcjonowania rdzenia kręgowego, aktywności pacjentów w ciągu dnia, zmniejszenie poziomu odczuwanego bólu neuropatycznego, poprawę funkcji seksualnych, zwieracza pęcherza i pracy jelit. W wielu kategoriach stan chorych został przekwalifikowany odpowiednio z ciężkiego na umiarkowanie ciężki oraz łagodny. Pomimo wyraźnej poprawy funkcjonalnej u chorych ocenianych według skali ASIA (ang. American Spinal Injury Association scale) oraz IANR-SCIFRS (ang. International Association of Neurorestoratology-Spinal Cord Injury Functional Rating Scale) badania neuroobrazowe nie wykazały zmian w obrazach morfologicznych oraz oznak regeneracji uszkodzonego rdzenia kręgowego (Vaquero i in., 2017; Larocca i in., 2017).

Podsumowując, dotychczasowe badania z wykorzystaniem modeli zwierzęcych oraz pierwsze z przeprowadzonych prób klinicznych transplantacji MSCs w schorzeniach OUN, wskazują, że komórki te wywierają pozytywne efekty terapeutyczne, a ich przeszczep jest bezpieczny i wydaje się nie wywoływać niepożądanych skutków ubocznych. Jednak, aby wyciągnąć jednoznaczne wnioski konieczne jest przeprowadzenie wielkoskalowych, ściśle kontrolowanych badań, które pozwolą poznać mechanizmy działania MSCs oraz ich los w organizmie po przeszczepie.

Tabela 1. Porównanie efektów transplantacji MSCs w wybranych chorobach OUN. Na podstawie Dasari i in., 2014; Hsuan i in., 2016; Lo Furno i in., 2018; Martinez i in., 2014; Ng i in., 2014. NB – nie badano; ND – nie dotyczy

| Badania przed-kliniczne | | | | | | | | | |
|--|------------|--------------------|------------------------------|---------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------------|---|----|
| | Udar mózgu | Choroba Alzheimera | Stwardnienie zanikowe boczne | Choroba Huntingtona | Choroba Parkinsona | Stwardnienie rozsiane | Uszkodzenie rdzenia kręgowego | | |
| Efekty transplantacji MSCs | | | | | | | | | |
| redukcja obrzęku OUN | + | NB | ND | + | ND | NB | ND | | |
| redukcja obszaru lezji | + | ND | + | ND | ND | + | + | | |
| wzmożenie angiogenezy | + | NB | NB | NB | NB | NB | NB | + | |
| poprawa integralności BBB | + | NB | ND | NB | NB | NB | NB | | NB |
| spadek liczby komórek apoptotycznych | + | + | + | + | + | NB | + | | + |
| stymulacja neurogenezy | + | + | NB | + | + | NB | NB | | + |
| stymulacja synaptogenezy | + | + | NB | NB | NB | NB | NB | | NB |
| remielinizacja aksonów | + | NB | NB | NB | ND | + | + | | + |
| zmiany stężeń cytokin i czynników wzrostu | + | NB | + | + | + | NB | + | | + |
| modulacja aktywności mikrogleju | + | + | NB | NB | NB | NB | NB | | + |
| redukcja depozytów białek patognomicznych | ND | + | NB | + | ND | ND | ND | | ND |
| poprawa stanu mitochondriów | NB | NB | + | + | + | NB | NB | | NB |
| wzmożenie oligodendrogenezy | + | NB | NB | NB | NB | + | + | | + |
| ograniczenie astroglejozy | NB | NB | NB | NB | NB | + | + | | + |
| redukcja stresu oksydacyjnego | NB | + | NB | NB | NB | NB | NB | | NB |
| ekspresja markerów komórek neuronalnych u MSCs | NB | + | - | + | + | NB | NB | | NB |
| ekspresja markerów komórek neuronalnych u MSCs | NB | + | + | + | NB | NB | NB | | + |
| wykazywanie cech komórek endotelialnych przez MSCs | NB | NB | + | NB | + | NB | NB | | NB |
| spowolnienie progresji choroby | ND | + | + | + | NB | + | + | | ND |
| poprawa funkcjonalna | + | + | + | + | + | + | + | | + |
| przedłużenie czasu przeżycia | NB | NB | + | + | NB | NB | NB | | ND |
| Badania kliniczne | | | | | | | | | |
| poprawa stanu klinicznego | + | - | + | NB | + | + | + | | + |
| redukcja wielkości lezji | + | ND | + | NB | NB | + | + | | - |
| spowolnienie progresji choroby | ND | NB | + | NB | NB | + | + | | ND |

1.3. Techniki wykorzystywane w celu wizualizacji przeszczepionych mezenchymalnych komórek macierzystych

Coraz większa liczba badań prowadzonych w celu określenia skutków terapii komórkowej pociąga za sobą konieczność stosowania nieinwazyjnych technik umożliwiających ścisłą kontrolę komórek macierzystych podczas procesu podawania chorym, wgląd w ich migrację, lokalizację tkankową oraz ocenę stopnia zasiedlania uszkodzonych obszarów, również w badaniach długoterminowych. Dotychczas opracowano szeroką gamę metod identyfikacji przeszczepionych MSCs zarówno w badaniach pre- jak i postmortem, większość z nich wymaga stosowania specjalnych znaczników wprowadzanych do komórek przed ich podaniem.

1.3.1. Znaczniki radioaktywne

Szerokie zastosowanie w dziedzinie medycyny znalazły pierwiastki radioaktywne. Jądra tych pierwiastków są niestabilne i podlegają samorzutnemu rozpadowi, podczas którego dochodzi do emisji promieniowania elektromagnetycznego. Techniki takie jak pozytonowa tomografia emisyjna (PET; ang. positron-emission tomography) i tomografia emisyjna pojedynczych fotonów (SPECT; ang. single-photon emission computed tomography) wykorzystują możliwość detekcji emitowanego podczas rozpadu promieniowania gamma w celu stworzenia trójwymiarowego obrazu rozmieszczenia radioaktywnych znaczników w organizmie po ich podaniu. Główna różnica pomiędzy wspomnianymi technikami dotyczy typu wykorzystywanych w nich radioizotopów. SPECT wykorzystuje izotopy emitujące pojedyncze fotony gamma, natomiast obrazowanie w PET odbywa się na podstawie detekcji promieniowania pochodzącego od pierwiastków, które najpierw generują pozytron, który po wejściu w kontakt z elektronami w otaczającej go tkance rozpada się produkując dwa współliniowe fotony gamma. Do głównych radioizotopów stosowanych w technice SPECT zalicza się: Technet-99m, Ind-111 i Gal-67, natomiast obrazowanie PET wykorzystuje rozpad jąder ¹⁸Fluoru, ¹¹Węgla, ¹³Azotu, ¹⁵Tlenu, Cyrkonu⁸⁹ oraz ¹²⁴Jodu. Dotychczas techniki PET i SPECT były wykorzystywane głównie w celach diagnostyki i terapii onkologicznej, jednak ostatnio, przy ich użyciu, podjęto również próby obrazowania przeszczepionych MSCs. Częsteczki zawierające radioizotopy są w łatwy sposób internalizowane przez komórki podczas inkubacji MSCs w medium zawierającym wysokie stężenia tych markerów. Istnieje jednak ryzyko wycieku radioizotopów z komórek. Ponadto przygotowanie samych radioizotopów jest skomplikowaną i kosztowną procedurą, która wymaga dostępu do wysoce wyspecjalizowanego sprzętu, co ogranicza ich użycie w badaniach podstawowych (Mathiasen i Kastrup, 2013; Kim i in., 2015). Kolejny problem jest związany z szybkim rozpadem, jakiemu podlegają jądra pierwiastków promieniotwórczych. Czas półtrwania radioizotopów jest liczony w przedziale od kilku godzin do kilku dni, co ogranicza maksymalny okres obserwacji wyznakowanych komórek. Ponadto duże dawki pierwiastków promieniotwórczych dodawane do medium hodowlanego, których zastosowanie jest konieczne dla osiągnięcia wystarczającej siły sygnału przy obrazowaniu mogą być dla komórek szkodliwe (Bonnema, Fast i Hegedüs, 2014). Pomimo to znakowanie MSCs przy użyciu radioizotopów jest powszechnie stosowane zarówno w badaniach podstawowych jak i klinicznych ze względu na bardzo dobrą czułość tej metody, a ponadto możliwość wykonania szybkiej analizy dystrybucji komórek w obrębie całego ciała (Khabbal i in., 2015).

Interesującym rozwiązaniem jest zastosowanie techniki PET w połączeniu z systemem genu reporterowego i jego radioaktywnego substratu. Można wyróżnić trzy główne klasy stosowanych genów reporterowych: enzymy, receptory i transportery. Gen reporterowy jest wprowadzony przy użyciu wektora ekspresyjnego, a jego białkowy produkt akumuluje się w transfekowanych komórkach. Następnie selektywnie oddziałuje on z podanym do środowiska substratem wyznakowanym radioaktywnie, co powoduje wybiórcze gromadzenie się promieniotwórczych cząsteczek w komórkach, które mogą być następnie wykryte poprzez obrazowanie PET. W przypadku MSCs

zastosowany został między innymi układ genu reporterowego *hERL* (ligand ludzkiego receptora dla estrogenu; ang. human estrogen receptor ligand), kodującego ludzki receptor dla estrogenu, który został wprowadzony do komórek przy użyciu zrekombinowanego wektora adenowirusowego. Przeszczepione u szczurów MSCs były następnie wykrywane dzięki dożylnemu podaniu biologicznie nieaktywnej formy estrogenu zawierającej radioaktywny izotop fluoru ^{18}F (16α [^{18}F] fluoro- 17β -estradiol). Po połączeniu się receptora z substratem możliwe było określenie lokalizacji przeszczepionych komórek w obrazowaniu PET (Qin i in., 2013). Podobnie stworzone zostały również analogiczne układy umożliwiające poza obrazowaniem zaindukowanie w dowolnie wybranym momencie śmierci przeszczepionych komórek. Tego typu system reprezentuje gen reporterowy kodujący kinazę tymidynową wirusa opryszczki - *sr39TK* (gen reporterowy kodujący kinazę tymidynową wirusa opryszczki), którego substrat stanowi 9-(4-(^{18}F -Fluoro-3-[hydroxymetylo]butylo)guanina ((^{18}F -FHBG). Dodatkowe podanie gancyklowiru umożliwia aktywację ścieżki programowanej śmierci komórkowej, jako że gen kinazy *sr39TK*, należy do grupy genów samobójczych i jego produkt białkowy odpowiada za przekształcenie gancyklowiru w toksyczny trifosforan gancyklowiru, który hamuje polimerazę DNA (kwas deoksyrybonukleinowy), powodując apoptozę komórek. Ewentualność eliminacji w dowolnym momencie przeszczepionych komórek, wydaje się być bardzo atrakcyjna w kontekście ryzyka wystąpienia u biorcy komplikacji i efektów ubocznych po transplantacji. Nie należy jednak zapominać, że stosowanie radioizotopów jest związane z ryzykiem niekontrolowanej śmierci jak również transformacji komórek w wyniku ich silnego napromieniowania, lub insercyjnej mutagenyzy wywołanej wprowadzeniem sekwencji genu reporterowego (Gschwend i in., 2014).

1.3.2. Środki kontrastowe stosowane do obrazowania w rezonansie magnetycznym

W praktyce klinicznej obrazowanie w tomografie rezonansu magnetycznego opiera się na obserwacji zjawiska magnetycznego rezonansu jądrowego jąder wodoru, które występują powszechnie we wszystkich tkankach organizmu. Poddane działaniu zewnętrznego statycznego pola magnetycznego jądra protonów ulegają wzbudzeniu, które można przedstawić w postaci wektora magnetyzacji położonego równolegle do wektora zewnętrznego pola magnetycznego – nazywanego wektorem magnetyzacji podłużnej. Dodatkowe użycie drugiego źródła zmiennego pola magnetycznego o orientacji wektora magnetycznego prostopadłej do pierwszego prowadzi do zmiany orientacji wektorów magnetyzacji jąder wodoru, które ustawiają się prostopadle do wektora magnetyzacji statycznego źródła zewnętrznego pola magnetycznego i są nazywane wektorami magnetyzacji poprzecznej. Wielkość wektora magnetyzacji jąder wodoru zależy od ich gęstości w danej tkance, co stanowi podstawę do odróżnienia od siebie danych tkanek w rezonansie magnetycznym, jednak nie jest wystarczające dla uzyskania obrazu o odpowiedniej, jakości. W celu poprawy kontrastu pomiędzy obrazowanymi tkankami stosowany jest dodatkowo pomiar czasu relaksacji, czyli okresu od wyłączenia źródła zewnętrznego zmiennego pola magnetycznego do powrotu wektorów magnetyzacji jąder protonów do stanu wyjściowego. Dla zaniku wektora magnetyzacji poprzecznej – używane jest określenia czasu relaksacji T2 (czas relaksacji poprzecznej; ang. spin-spin relaxation time; T2 time), natomiast dla pojawiania się wektora magnetyzacji podłużnej jest to czas T1 (czas relaksacji podłużnej; ang. spin-lattice relaxation time; T1 time) (MRI in Practice, 4th Edition, 2018). Okresy te stanowią właściwość wsobną każdej tkanki. Istnieją związki, które powodują przyspieszenie osiągnięcia stanu relaksacji tkanek je zawierających, co poprawia kontrast uzyskanych obrazów i stąd nazywa się je środkami kontrastowymi. Do najpowszechniej stosowanych środków kontrastowych wpływających na skrócenie czasu relaksacji T1 zalicza się związki gadolinu i manganu. Jako pierwiastek gadolin charakteryzuje się spontaniczną magnetyzacją, oraz zdolnością wzmocnienia zewnętrznego pola magnetycznego, jednak w tej formie jest silnie toksyczny. Wiąże się on w sposób nieodwracalny z tkankami i kumuluje w organizmie. W celu ograniczenia jego toksyczności tworzone są połączenia gadolinu ze związkami chelatującymi, które blokują aktywne miejsca wiązania jonów gadolinu i w

znacznym stopniu neutralizują jego szkodliwe działanie. Związki gadolinu mają właściwości paramagnetyczne i są zaliczane do środków pozytywnych, czyli wzmacniających sygnał pochodzący z obszaru, który zajmują. Można je podzielić na związki działające zewnątrzkomórkowo, dzięki którym można zobrazować ich przepływ tkankowy oraz związki wnikające do komórek, do których mają powinowactwo, czyli środki wewnątrzkomórkowe (Xiao i in., 2016). Właśnie ta grupa związków była wykorzystywana do obrazowania przeszczepianych MSCs (Tachibana i in., 2014). Wydajne znakowanie tych komórek można uzyskać dzięki ich inkubacji w hipo-osmotycznym roztworze związków gadolinu. Niestety ich akumulacja w komórkach jest związana z ryzykiem wystąpienia cytotoksyczności jak i uwolnieniem toksycznych jonów gadolinu po przeszczepie w organizmie gospodarza (Ishibashi, Hirao, Yamaguchi i Nabekura, 2009; Filippi i in., 2016). Innym przykładem wykorzystywanych do znakowania MSCs paramagnetycznych, pozytywnych środków przyspieszających czas relaksacji T1 są związki kontrastowe zawierające jony manganu, jednak dotychczas niewiele jest wiadomo na temat ich wpływu na komórki (Yamada i in., 2009). W przeciwieństwie do omawianych wyżej, związki o właściwościach superparamagnetycznych mają zdolność do przyspieszania czasu relaksacji T2. W praktyce stosowane są najczęściej nanocząstki tlenku żelaza (SPIO; ang. superparamagnetic iron oxide nanoparticles) oraz ultra-małe nanocząstki tlenku żelaza (USPIO; ang. ultra small superparamagnetic iron oxide particles). W obrazowaniu w MRI ich zastosowanie powoduje zaciemnienie obszarów, w których są zlokalizowane (Xiao i in., 2016). Znakowanie MSCs przy użyciu SPIO odbywa się dzięki ich kilkugodzinnej inkubacji w roztworze znacznika (Riegler i in., 2013). Zasadniczą zaletą SPIO jest generowanie bardzo silnego sygnału co potencjalnie pozwala na detekcję niemal pojedynczych komórek. Dodatkowe modyfikacje otoczki nanocząstek, takie jak pokrycie ich dekstranem, chitozanem lub cytrynianem, poprawiają ich stabilność, zwiększają internalizację nanocząstek przez znakowane komórki, jak również umożliwiają przyłączenie do nich dodatkowych elementów takich jak przeciwciała oraz leki (Andreas i in., 2012; Bakhru i in., 2012). Dotychczas nanocząstki tlenku żelaza były wykorzystywane między innymi do obrazowania MSCs przeszczepianych w modelach udaru mózgu u zwierząt oraz w uszkodzeniach naczyń krwionośnych (Riegler i in., 2013; Tarulli i in., 2013). Historycznie były one jednym z pierwszych środków stosowanych do obrazowania wątroby u ludzi ze względu na bardzo silne właściwości kontrastowe. Jednak aktualnie, pomimo ich wielu zalet zostały one wycofane z użytku klinicznego z powodów finansowych (Kawamori i in., 1992). Wadą superparamagnetycznych środków kontrastowych jest negatywny sygnał, który utrudnia interpretację obrazu ze względu na możliwość pojawienia się jego endogennego źródła w tkance takiego jak na przykład wynaczyniona krew. Jednak to ograniczenie może zostać wyeliminowane poprzez zastosowanie obrazowania cząsteczek magnetycznych (magnetic particle imaging; MPI), nowej, ale szybko rozpowszechniającej się metody obrazowania (Janowski i in., 2015). Dodatkowo związki żelaza mogą pozostawać w tkance nawet po śmierci komórek, co ogranicza ich stosowanie do długotrwałej obserwacji przeszczepionych komórek. Kluczową zaletą SPIO jest jednak wysoką czułość jego detekcji, która pozwala na osiągnięcie bardzo dobrego poziomu precyzji podania w czasie rzeczywistym (Walczak i in., 2017). Kolejną grupą związków kontrastowych stosowanych w obrazowaniu MSCs przy użyciu MRI są środki oparte na pierwiastkach niemetalów takie jak np. Fluor. Jednak sygnał przez nie generowany jest znacząco słabszy niż w przypadku pozostałych grup, co wpływa negatywnie na próg wykrywalności przeszczepianych komórek (Shen i in., 2010; Ahrens i Bulte, 2013). Jednak zaletą zastosowania fluoru do obrazowania jest możliwość uzyskania ilościowej informacji o liczbie atomów fluoru w przeliczeniu na voksel, co potencjalnie pozwalana na kwantyfikację przeszczepionych komórek.

1.3.3. Środki wykorzystywane w technice bioluminescencji

Bioluminescencja to zdolność do produkcji i emisji światła widzialnego przez organizmy żywe, będąca wynikiem reakcji chemicznych, podczas których, energia chemiczna zamieniana jest w energię świetlną. Zjawisko to jest aktualnie szeroko wykorzystywane w badaniach biotechnologicznych w celu

identyfikacji określonej populacji komórek. Wykorzystując technikę bioluminescencji do wizualizacji komórek, najczęściej wprowadza się do nich metodą transfekcji wirusowej gen kodujący enzym lucyferazę, który w obecności ATP (adenozyno-5'-trifosforan; ang. adenosine triphosphate) i tlenu ma zdolność katalizowania reakcji utleniania lucyferyny. Jej produkt stanowi oksylucyferyna, która ulega rozpadowi emitując światło, co przejawia się w postaci zjawiska luminescencji. Zmienione genetycznie komórki przeszczepia się do organizmu gospodarza, który otrzymuje roztwór lucyferyny podany systemowo, a światło generowane w odpowiedzi na jego obecność jest zbierane przez specjalny światłoczuły detektor, co pozwala na określenie lokalizacji przeszczepu w organizmie. Czułość opisywanej metody jest zależna od kilku czynników, takich jak: wydajność procesu transfekcji, właściwości optyczne układu i głębokość, na jakiej położone są przeszczepione komórki (Rice, Cable i Nelson, 2001). Największe wyzwanie dla obrazowania w warunkach *in vivo* stanowi przejście wyemitowanego fotonu światła przez tkanki gospodarza, tak, aby mógł on zostać wykryty na zewnątrz. Dlatego też detekcja komórek zlokalizowanych powierzchniowo jest znacznie wydajniejsza niż tych zlokalizowanych w głębi tkanek organizmu. Siła sygnału generowanego w technice bioluminescencji spada dziesięciokrotnie przy każdym dodatkowych 10 mm zagłębienia jej źródła w tkance (Weissleder, 2001). W celu rozwiązania tego problemu prowadzone są aktualnie badania nad modyfikacją właściwości farmakokinetycznych podawanej lucyferyny, takich jak wydłużony czas rozkładu, oraz pozwalających na emisję światła przesuniętego w spektrum w kierunku światła czerwonego, które jak wiadomo charakteryzuje się lepszą penetracją przez tkanki. Podejmuje się również próby ingerencji w działanie transporterów klasy ABC, których zablokowanie pozwala zwiększyć akumulację lucyferazy w komórkach (Evans i in., 2014; Huang, Vider, Serganova i Blasberg, 2011). Istnieje kilka gatunków zwierząt i bakterii, które charakteryzują się naturalną bioluminescencją, a enzymy przez nie wytwarzane nieco różnią się od siebie sekwencją genową i właściwościami. Wśród nich wyróżniamy najpowszechniej stosowaną Fluc (lucyferaza świetlika; ang. firefly luciferase) izolowaną od *Photinus pyralis* - świetlika północno-amerykańskiego, *Renilla* (RLuc; lucyferaza *Renilla reniformis*; ang. *Renilla luciferase*) pochodzącą od meduz *Aequorea victoria* oraz *Tenilla* typową dla koralów (Hastings, 1996). Różnorodność typów aktualnie dostępnych lucyferaz pozwoliła, poza określeniem samej lokalizacji przeszczepionych komórek, badać również oddziaływanie MSCs z innymi komórkami obecnymi w organizmie gospodarza. Dzięki wyznakowaniu MSCs przy użyciu RLuc, a komórek rakowych Fluc wykazano, że MSCs mają zdolność do blokowania progresji procesu nowotworzenia (Leng i in., 2014). Do głównych zalet obrazowania przeszczepionych komórek z wykorzystaniem zjawiska bioluminescencji można zaliczyć wysoką przepustowość tej techniki i łatwość uzyskania komórek charakteryzujących się ekspresją lucyferazy, która wydaje się nie wykazywać działania cytotoksycznego. Jednak przy jej pomocy uzyskuje się obrazy o bardzo niskiej rozdzielczości przestrzennej dające informacje jedynie o generalnej lokalizacji komórek *in vivo* w obrębie narządu lub obszaru ciała. Ponadto niewielkie zmiany właściwości optycznych tkanki takie jak zmiana koloru czy krwotok mogą mieć istotny wpływ na uzyskany wynik. Jednocześnie w związku z koniecznością wprowadzenia do komórek konstruktów niosącego gen lucyferazy, wbudowanego się w DNA pojawia się ryzyko wystąpienia procesu insercyjnej mutagenyzy (Kim, Kalimuthu i Ahn, 2015). Podsumowując, bioluminescencja może być stosowana tylko w przypadku, gdy źródło światła jest zlokalizowane stosunkowo powierzchniowo i jest wykorzystywana głównie w badaniach na gryzoniach. Wysoka zależność występująca pomiędzy głębokością, na której położone jest źródło światła, a intensywnością sygnału utrudnia porównanie jego natężenia pomiędzy poszczególnymi osobnikami, natomiast technika ta bardzo dobrze sprawdza się w badaniach długoterminowych, prowadzonych w celu analizy dynamiki proliferacji lub przeżywalności przeszczepu u poszczególnych zwierząt.

1.3.4. Znaczniki fluorescencyjne

Innym rodzajem znaczników, stosowanych w badaniach wizualizacji przeszczepionych komórek są markery fluorescencyjne. Fluorescencja to proces, w którym światło jest emitowane przez wzbudzoną cząsteczkę lub atom w związku z procesem oddania przez nią nadmiaru dostarczonej energii. Do wzbudzenia dochodzi na skutek absorpcji kwantu światła o określonej długości fali, a emitowane jest zawsze światło o fali dłuższej od długości fali zaabsorbowanej. Cząsteczki, które charakteryzują się naturalną zdolnością do pochłaniania i emisji światła nazywane są fluorochromami i są często wykorzystywane w badaniach mających na celu obserwację znakowanych nimi komórek w warunkach *in vitro* jak również analizę post-mortem ich położenia w tkankach organizmów, do których były przeszczepione. Pierwszą dużą grupę znaczników fluorescencyjnych stanowią karboksyfluoresceiny wiążące się z błoną komórkową. W związku z ich właściwościami lipofilnymi wnikają one do komórek na drodze dyfuzji znakując zarówno zewnętrzną błonę komórkową jak i wewnątrzkomórkowe struktury błonowe. Przykładem takich znaczników są związki PKH26 oraz CM-Dil, które były z powodzeniem stosowane również do znakowania MSCs (Nagyova i in., 2014). Ich zaletami jest generowanie silnego i długotrwałego sygnału fluorescencyjnego, który jednak ulega osłabieniu w przypadku podziałów mitotycznych wyznakowanych komórek. Stosowanie lipofilnych znaczników jest ponadto obarczone ryzykiem uzyskania fałszywie pozytywnych wyników, gdyż może dojść do pochłonięcia przez okoliczne komórki obecne w tkance gospodarza cząsteczek fluorescencyjnych wydzielonych na drodze dysocjacji barwnika z wyznakowanych pierwotnie przeszczepionych komórek oraz po ich śmierci fagocytozy fluorescencyjnych resztek komórkowych przez makrofagi (Ferrari i in., 2001; Lassailly, Griessinger i Bonnet, 2010). Inne z karboksyfluorescein po wniknięciu do wnętrza komórki mogą być hydrolizowane przez niespecyficzne esterazy do ujemnie naładowanych związków wiążących grupy aminowe łączące się kowalencyjnie z komponentami cytoplazmy stając się aktywne fluorescencyjnie. Sygnał przez nie generowany jest długotrwały, jednak przy częstym wzbudzaniu szybko ulega znacznemu osłabieniu (wyświeceniu), a badania pokazują, że związki te mogą być dla znakowanych nimi komórek cytotoksyczne (Progatzyk, Dallman i Lo Celso, 2013; Last'ovicka, Budinský, Spísek i Bartůnková, 2009). Najpowszechniej stosowanymi dla MSCs znacznikami z tej grupy są estrowe pochodne diocetanu karboksyfluoresceiny takie jak CFDA-SE i CFSE (Urbani i in., 2006; Polzer i in., 2012). Kolejną grupą znaczników fluorescencyjnych są związki wiążące się w sposób niekowalencyjny z dwuniciowymi cząsteczkami DNA, takie jak Hoechst (Fenol,4-[5-(4-metylo-1-piperazynyl)[2,5'-bi-1H-benzimidazol]-2'-yl]-, trihydrochlorok) oraz DAPI (4',6-diamidyno-2'-fenyloindol dichlorowodorek). Znajdują one swoje zastosowanie głównie przy pracy z wcześniej utrwalonymi komórkami w badaniach immunocytochemicznych oraz cytometrycznych, jednak możliwe jest ich użycie również do śledzenia komórek po przeszczepie (Castanheira i in., 2009). Problem związany z ich użyciem do znakowania żywych komórek stanowi słaba penetracja omawianych znaczników przez nieuszkodzoną błonę komórkową. Ponadto ich zastosowanie także obarczone jest ryzykiem przejęcia znacznika przez komórki gospodarza, co było pokazane po przeszczepie MSCs znakowanych DAPI do siatkówki oka u szczurów (Castanheira i in., 2009).

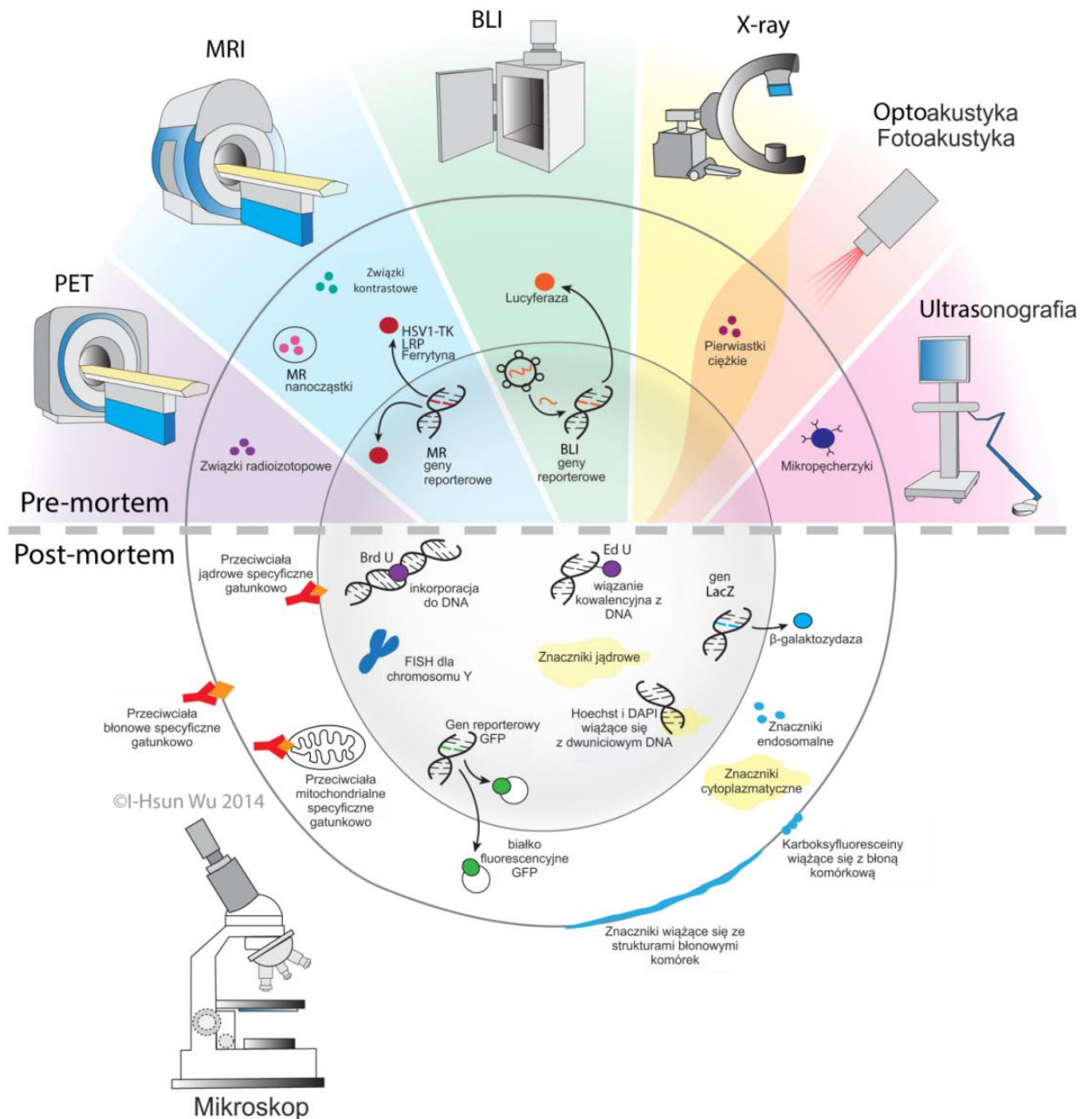
1.3.5. Geny reporterowe

Kolejnym cennym narzędziem stosowanym w celu określenia obecności i lokalizacji *in vivo* przeszczepianych komórek są systemy genów reporterowych. Gen reporterowy jest to najczęściej sekwencja DNA, która po wprowadzeniu do komórek powoduje ujawnienie się w nich charakterystycznych cech umożliwiających ich jednoznaczną identyfikację. Do cech dobrego genu reporterowego zalicza się to, że nie występuje w postaci naturalnej w organizmie, jego efekt widoczny jest w postaci łatwo dostrzegalnej zmiany fenotypu, nie zakłóca metabolizmu i fizjologii komórek, do których został wprowadzony oraz charakteryzuje się dużą łatwością i czułością detekcji (Remington, 2011). Większość genów reporterowych wymaga dostarczenia dodatkowych substratów w celu

wykrycia ich ekspresji, jednak istnieją wyjątki. Do najczęściej stosowanych genów reporterowych należą białka fluorescencyjne, które są aktualnie dostępne w różnych wariantach spektrum fluorescencji - emitując światło w kolorze niebieskim (BFP; białko niebieskiej fluorescencji; ang. blue fluorescent protein), zielonym (GFP; białko zielonej fluorescencji; ang. green fluorescent protein), żółtym (YFP; białko żółtej fluorescencji; ang. yellow fluorescent protein) lub czerwonym (mCherry, DsRed; białka czerwonej fluorescencji; ang. red fluorescent proteins). Historycznie, jako pierwsza pozyskana została sekwencja białka GFP, którą uzyskano od endogennie go syntetyzującej meduzy *Aequorea victoria*. Jednak po wprowadzeniu genu *gfp* do rozwijających się zarodków organizmów transgenicznych zaobserwowano, że poziom ekspresji tego białka w poszczególnych komórkach zwierząt jest zróżnicowany. W swojej pracy Harting i współpracownicy pokazali, że jedynie około 50 % MSCs izolowanych od transgenicznych szczurów z wprowadzonym konstruktem *gfp*, charakteryzuje się zieloną fluorescencją (Harting, Jimenez i Cox, 2009). W związku z niezadowalającą wydajnością i dużym kosztem tej techniki uzyskiwania komórek charakteryzujących się obecnością białek fluorescencyjnych, aktualnie najczęściej stosuje się modyfikacje opierające się o wprowadzenie sekwencji genu reporterowego poprzez transfekcje *in vitro* komórek ekspresyjnym wektorem wirusowym kodującym go (Czernik i in., 2013). Możliwość użycia GFP w celu identyfikacji komórek po przeszczepie jest częściowo ograniczona ze względu na istnienie autofluorescencji większości tkanek, jak również z uwagi na słabą penetrację sygnału fluorescencyjnego przez ich warstwy (Chartoff i in., 2011). Ogranicza to stosowanie komórek znakowanych przy użyciu białek fluorescencyjnych do analizy wykonywanej post-mortem, najczęściej z zastosowaniem dodatkowych przeciwciał skierowanych przeciwko produktowi genu reporterowego w celu wzmocnienia generowanego sygnału fluorescencyjnego (Leroux i in., 2010). Inny przykład genu reporterowego stanowi sekwencja *LacZ* kodująca hydrolityczny enzym bakterii *Escherichia coli* β -galaktozydazę. Po przeszczepie do organizmu gospodarza komórki, do których wprowadzono ten gen reporterowy można zidentyfikować w tkance dzięki ich zdolności do przekształcania bezbarwnego związku, jakim jest X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -D-galaktopiranozyd) do niebieskiego produktu, która to reakcja jest przeprowadzana przez β -galaktozydazę. Przykład takiego postępowania został zaprezentowany również w przypadku identyfikacji MSCs podawanych u szczurów z ischemicznym uszkodzeniem mózgu (Komatsu i in., 2010). Istnieją jednak doniesienia o pojawianiu się endogennej ekspresji β -galaktozydazy w pewnych grupach komórek eukariotycznych, włączając w to starzejącą się populację MSCs. Taka sama sytuacja dotyczy kolejnego z szeroko stosowanych genów reporterowych kodujących fosfatazę alkaliczną, która naturalnie występuje w tych komórkach (Gao i in., 2017; Cotarelo i in., 2016). Fakt ten dyskryminuje stosowanie powyższych enzymów, jako wiarygodnych genów reporterowych dla MSCs.

Wszystkie opisane w powyższym podrozdziale metody umożliwiają jedynie analizę post-mortem lokalizacji przeszczepionych komórek, co stanowi ich największą wadę w porównaniu do technik opisanych wcześniej. Ponadto dane uzyskane na ich podstawie dają jedynie wybiórcze informacje o elementach procesów, jakim podlegają przeszczepione komórki gdyż nie ma możliwości obserwacji przy ich użyciu ciągłości zdarzeń zachodzących w sekwencji czasowej.

Opracowanie metody wydajnego i bezpiecznego znakowania przeszczepianych komórek macierzystych jest warunkiem koniecznym dla dalszego rozwoju wiedzy o ich potencjale terapeutycznym. Wszystkie z wyżej opisanych metod mają swoje wady i zalety, a świadomość ich istnienia jest bardzo ważna dla każdego użytkownika, aby możliwe było dobranie optymalnej techniki śledzenia podanych komórek na potrzeby danego układu eksperymentalnego.



Ryc. 3. Zestawienie technik stosowanych aktualnie do obrazowania komórek macierzystych po przeszczepie w badaniach podstawowych i klinicznych (na podstawie Andrzejewska i in., 2015).

1.4. Sposoby przeszczepiania komórek macierzystych stosowane w terapii uszkodzeń OUN

Sposób podania przeszczepianych komórek macierzystych wywiera znaczący wpływ na ich lokalizację w organizmie, biodystrybucję w obrębie danej tkanki jak również wydajność zasiedlania przez nie obszaru objętego uszkodzeniem. W przypadku uszkodzenia struktur OUN do najczęściej wykorzystywanych dróg podania komórek zalicza się transplantację miejscową oraz systemową, jak również względnie nową technikę przeszczepiania komórek donosowo. Podanie miejscowe odbywa

się zazwyczaj poprzez stereotaktyczne wstrzyknięcie zawiesiny komórek do płynu mózgowo-rdzeniowego albo bezpośrednio do parenchymy mózgu w tym do miejsca uszkodzenia lub w dużej jego bliskości. Podejście to pozwala uzyskać bardzo dużą liczbę przeszczepionych komórek skumulowaną w określonej lokalizacji, jednak w przypadku lezji o charakterze rozsianym lub obejmującej znaczny obszar narządu nie zapewnia ono odpowiedniej dystrybucji przeszczepionych komórek. Dodatkowo duże zagęszczenie podanych w ten sposób komórek może doprowadzić do ich przedwczesnej śmierci, ze względu na ograniczenie możliwości wydajnej dyfuzji tlenu i związków odżywczych w tak dużych skupiskach (Muschler, Nakamoto i Griffith, 2004). Ponadto podczas procedury przeszczepiania konieczne jest wprowadzenie do bardzo wrażliwych tkanek mózgu urządzenia dozującego komórki takiego jak kaniula, co może wywołać krwotok lub uszkodzenie istotnych ośrodków, prowadząc do zaburzeń funkcjonalnych u pacjentów. W przypadku podania komórek do płynu mózgowo-rdzeniowego do problemów opisanych powyżej dochodzi ryzyko nieprawidłowości jego przepływu, co może zainicjować rozwój wodogłowia (Boltze i in., 2015).

Transplantacja systemowa odbywa się zazwyczaj poprzez dożylną iniekcję komórek i charakteryzuje się ona brakiem inwazyjności chirurgicznej. W przypadku podania dożylnego, przeszczepione komórki często pojawiają się w uszkodzonym obszarze mózgu dopiero po upływie kilku dni od ich iniekcji w niewielkiej liczbie. Natomiast droga dotętnicza wydaje się atrakcyjną kombinacją zalet podania domózgoweo i systemowego. Podanie komórek drogą dotętniczną prowadzi do niemal natychmiastowego dostarczenia komórek do rejonu lezji, zazwyczaj w postaci rozsianych na całej jego przestrzeni niewielkich skupisk, ponadto bez konieczności naruszania ciągłości ośrodkowego układu nerwowego, który jest niezwykle wrażliwy na wszelkie manipulacje (Li i in., 2010b). Tak więc podanie dotętnicze potencjalnie może skutować szybszym zasiedlaniem uszkodzenia przez większą liczbę przeszczepionych komórek o bardziej jednorodnej i obejmującej znaczny obszar dystrybucji niż dostarczanie ich poprzez iniekcję dożylną. Jednym z podstawowych problemów związanych z transplantacją przeznaczyniową komórek są dalsze losy tej populacji komórkowej, która nie zasiedliła obszaru uszkodzenia. Według danych literaturowych nawet 90 % komórek podanych dożylnie, kumuluje się w naczyniach krwionośnych płuc (Pendharkar i in., 2010). Może to prowadzić do powstawania zatorów w płucach, które stanowią zagrożenie życia, a przypadki ich występowania opisywano zarówno u zwierząt jak i u ludzi (Yamamoto, 1985; Jung i in., 2013). Podane dożylnie komórki wykrywane były również w innych narządach takich jak nerki, śledziona oraz wątroba (Hicks i Jolkonen, 2009). W przypadku iniekcji dotętnicznej komórek ich depozycja w płucach jest znacznie mniejsza (Mäkelä i in., 2015), a większość z nich po wstrzyknięciu obserwowana jest w uszkodzonym obszarze mózgu (Pendharkar i in., 2010), jednak już kilka godzin później znaczna część komórek ulega przemieszczeniu do narządów peryferyjnych, w tym głównie do wątroby, nerek i śledziony (Khabbal i in., 2015). Przeszczep dotętniczny może wiązać się z ryzykiem powstania mikroudarów na skutek zamknięcia przez podane komórki światła naczyń krwionośnych o małej średnicy w mózgu. W modelach zwierzęcych obserwowano takie sytuacje zachodzące jednocześnie z obniżeniem mózgowego przepływu krwi podczas infuzji (Cui i in., 2015). Stwierdzono również korelację pomiędzy liczbą powstałych po podaniu uszkodzeń a dawką komórek i prędkością ich podania. Najnowsze wyniki naszych badań pokazują jednak, że możliwe jest uniknięcie powstania niepożądanych efektów ubocznych wstrzyknięć dotętnicznych poprzez precyzyjne dostosowanie prędkości infuzji i liczby komórek w zależności od ich wielkości (Janowski i in., 2013).

Podanie donosowe zostało pierwotnie rozwinięte, jako strategia dostarczania do struktur OUN leków. Ich przenikanie odbywa się poprzez transport wewnątrzkomórkowy taki jak: pinocytoza, endocytoza lub dyfuzja, kiedy podane do jamy nosowej leki są pochłaniane przez komórki podporowe, neurony węchowe dwubiegunowe oraz odgałęzienie szczękowe nerwu trójdzielnego, które dalej

dostarczają je do opuszki węchowej oraz innych obszarów mózgu. Możliwe jest również przenikanie leku ścieżką zewnątrzkomórkową, prawdopodobnie przez połączenia pomiędzy komórkami podporowymi lub przez przestrzenie pomiędzy nimi a komórkami węchowymi. Dostarczane w ten sposób substancje mogą przenikać do mózgu lub płynu mózgowo-rdzeniowego. Zewnątrzkomórkowa droga podania zapewnia znacznie szybszy, liczony w minutach czas dostarczenia preparatu, podczas gdy proces ten trwa od kilku godzin do nawet kilku dni w przypadku ścieżki wewnątrzkomórkowej (Li, Feng, Zhang i Ma, 2015c). Dla niektórych leków wykazano, że podanie donosowe charakteryzuje się znacznie wydajniejszą absorpcją aktywnie biologicznej substancji do mózgu w porównaniu do iniekcji dożylniej, co pozwala istotnie zmniejszyć dawkę podawanego środka przy zachowaniu takiego samego poziomu jego skuteczności (Li i in., 2014). Najefektywniej dostarczane są niskocząsteczkowe związki lipofilne. Podanie przy użyciu drogi donosowej komórek jest utrudnione, głównie w związku z ich istotnie większym rozmiarem (Bahadur i Pathak, 2012). Pomimo, że niektóre prace poddają w wątpliwość skuteczność dostarczenia MSCs ścieżką donosową, inni autorzy twierdzą, że po transplantacji mezenchymalnych komórek macierzystych w chorobach OUN są one obserwowane w obszarze opuszki węchowej, wzgórze, podwzgórze, prążkowie, pnia oraz kory mózgu (Chartoff i in., 2011; Danielyan i in., 2011). Dodatkowe zastosowanie substancji rozszczełniających warstwę błony śluzowej jamy nosowo-gardłowej, takich jak hialuronidaza, pozwala zwiększyć obszar zajmowany przez podane komórki, które są widoczne w mózgu już po 1.5 godziny od ich aplikacji (Wei i in., 2013). Okazało się jednak, że wiąże się to z ryzykiem wystąpienia zapalenia opon mózgowych, umożliwiając przenikanie pneumokoków i innych bakterii z jamy nosowej do krwioobiegu (Zwijnenburg i in., 2001). Do głównych zalet donosowego podania komórek niewątpliwie można zaliczyć łatwość przeprowadzenia procedury i jej minimalną inwazyjność. Natomiast zasadniczą wadą drogi donosowej jak i systemowej jest brak kontroli nad biodystrubucją komórek w obrębie układu nerwowego. Należy jednak wspomnieć, że możliwe jest wystąpienie działań niepożądanych w postaci odczynów zapalnych, uszkodzeń błony śluzowej nosogardzieli oraz reakcji alergicznych. Podanie donosowe pozwala również uniknąć ryzyka depozycji nadmiernej liczby komórek w organach peryferycznych, jednak mechanizm ich przenikania do mózgu i dokładne losy podanych komórek nie zostały do tej pory wystarczająco dobrze wyjaśnione, aby procedurę tą można uznać za w pełni bezpieczną i wydajną.

1.5. Transfer komórek endo- i egzogennych z łożyska naczyniowego do struktur OUN

Podania systemowe oraz dotętnicze komórek są aktualnie najczęściej stosowanymi technikami w próbach leczenia schorzeń OUN z wykorzystaniem transplantacji komórek macierzystych. Jednym z głównych problemów związanych z ich stosowaniem jest fakt, że przeszczepione komórki muszą wyjść z łożyska naczyniowego, aby przedostać się do obszaru mózgu objętego procesem chorobowym. Proces ten jest utrudniony ze względu na istnienie specyficznych dla ośrodkowego układu nerwowego barier takich BBB (bariera krew-mózg; ang. blood-brain barrier), BCSFB (bariera krew-płyn mózgowo-rdzeniowy; ang. blood-cerebrospinal fluid barrier) oraz BLMB BME (bariera krew-opony mózgu; ang. blood-leptomeningeal barrier). Ich rolą jest ochrona struktur OUN przed wnikaniem potencjalnie szkodliwych substancji, które mogą być obecne we krwi. W stanie fizjologicznym istnienie tych barier uniemożliwia przenikanie komórek do parenchymy mózgu, jednak w odpowiedzi na uszkodzenie niektóre z komórek układu immunologicznego, takie jak leukocyty, nabierają zdolności do przechodzenia przez wyżej wymienione bariery, proces ten nazywany jest diapedezą.

1.5.1. Budowa i funkcje bariery krew-mózg

Bariera krew-mózg obejmuje naczynia krwionośne mózgu na poziomie kapilar i żyłek o najmniejszej średnicy znajdujących się bezpośrednio za nimi (żyłek post kapilarnych). W naczyniach tych komórki śródbłonka otoczone są przez perycyty oraz astrocyty. Struktury te tworzą trwałą i szczelną barierę, która jest odpowiedzialna za regulację przepuszczalności mikronaczyń, zachowanie odpowiedniego gradientu stężenia jonów, makromolekuł i neuroprzekaźników po obydwu stronach bariery jak również usuwanie związków toksycznych oraz transport składników odżywczych do mózgu (Blanchette i Daneman, 2015). Komórki śródbłonka stanowią zlokalizowaną najbliżej światła naczynia warstwę bariery krew-mózg. Po stronie bazalnej przylegają one do błony podstawnej, w której są zakotwiczone przez białka adhezyjne. Poszczególne komórki śródbłonka są powiązane między sobą poprzez połączenia, które szczelnie zamykają przestrzenie międzykomórkowe. Dodatkowo, w przeciwieństwie do komórek śródbłonka, które występują w naczyniach obwodowych, komórki endotelialne naczyń krwionośnych mózgu nie posiadają fenestracji a częstość przeprowadzanego przez nie procesu transcytozy jest znacznie zredukowana, charakteryzują się one również silną polaryzacją w przestrzeni apikalno-bazalnej. W części apikalnej ich błony komórkowej zawarte są transportery związków odżywczych - takie jak GLUT-1 (transporter glukozy-1; ang. glucose transporter 1) – przenośnik glukozy oraz typu LAT1 (transporter dużych aminokwasów 1; ang. L-type amino acid transporter 1), który uczestniczy w dostarczaniu do OUN aminokwasów – oraz kompleksy białek odpowiedzialne za wydzielanie zbędnych produktów metabolizmu tkanki nerwowej do krwi takie jak glikoproteina P. Fizjologicznie na powierzchni komórek endotelialnych tworzących BBB znajduje się również bardzo niewiele białek adhezyjnych (Correale i Villa, 2009). Komórki śródbłonka naczyń krwionośnych mózgu są powiązane ze sobą bocznie poprzez połączenia typu AJ (połączenia przylegające; ang. adherence junction) oraz połączenia ścisłe (TJ; ang. tight junction). Głównymi białkami tworzącymi AJ są VE-kadheryna (kadheryna śródbłonka naczyniowego; ang. vascular endothelial cadherin), koneksyna 43 oraz N-kadheryna (kadheryna neuronalna; ang. neural cadherin). VE-kadheryna tworzy połączenia homofilowe i stabilizuje wiązanie pomiędzy komórkami śródbłonka. Jest ona receptorem transbłonowym zależnym od jonów wapnia. Jej koniec cytoplazmatyczny jest połączony z białkami z rodziny katenin, które zapewniają utrzymanie kadheryn w błonie komórkowej chroniąc je przed degradacją, a jednocześnie zapewniają ich połączenie z filamentami aktynowymi cytoszkieletu komórek. Aktywacja wewnątrzkomórkowych ścieżek sygnałowych indukujących zmiany fosforylacji katenin powoduje spadek siły wiązania tego kompleksu, co prowadzi do internalizacji kadheryn i ich rozpadu w proteasomach. Może to powodować wzrost przepuszczalności AJ (Julius, 2009). W skład połączeń ścisłych (TJ) wchodzi białka adhezyjne takie jak kładyny, okludyny i białka JAM (cząsteczka adhezyjna połączeń; ang. junctional adhesion molecule). Kładyny stanowią rodzinę białek transmembranowych czterokrotnie przechodzących przez błonę komórkową, mają one dwie pętle położone zewnątrzkomórkowo oraz krótki odcinek cytoplazmatyczny. Z dotychczasowych badań wynika, że kładyna 3, 5 i 12 uczestniczą w utrzymaniu stabilności bariery krew-mózg. Zaburzenia ekspresji kładyny 5 powodują rozpad BBB, ponadto białko to odgrywa istotną rolę w procesie selektywnego przechodzenia przez barierę cząsteczek w zależności od ich rozmiaru (Yang i Rosenberg, 2011). Łańcuch białkowy okludyn również czterokrotnie przecina błonę komórkową, jest zakończony krótką domeną cytoplazmatyczną po jednej stronie, a po drugiej pętlami, które mogą wchodzić w oddziaływania homofilowe z innymi okludynami, bądź łączyć się z białkami z rodziny kładyn. Wewnątrz komórki śródbłonka zarówno kładyny jak i okludyny łączą się z elementami cytoszkieletu poprzez białka kompleksu zonula occludens (ZO; obwódka zamykająca; ang. zona occludens) (ZO-1, ZO-2 oraz ZO-3), co zapewnia ich stabilizację w błonie komórkowej. Białka JAM stanowią podgrupę rodziny receptorów immunoglobulinowych (Ig) zawierającą dwie zewnątrzkomórkowe domeny Ig-podobne. Białka JAM-A oraz JAM-C współtworzą połączenia ścisłe wchodząc w oddziaływania homofilowe,

jednak mają również zdolność do wiązania innych rodzajów białek adhezyjnych takich jak integryny. Poza obecnością wyżej wymienionych białek stanowiących komponenty AJ i TJ, na powierzchni komórek śródbłonna współtworzących BBB można odnaleźć receptory uczestniczące w ich kontakcie z innymi komórkami, są to między innymi: PECAM-1 (płytkowo-śródbłonkowa cząsteczka adhezji komórkowej 1, ang. platelet endothelial cell adhesion molecule 1), ICAM-1, ICAM-2 (ICAM; cząsteczka adhezji międzykomórkowej; ang. intercellular adhesion molecule), oraz CD99 (Van Itallie i Anderson, 2014). Do komórek śródbłonna naczyń mózgowych od strony błony podstawnej przylegają perycyty, które wytwarzają komponenty macierzy zewnątrzkomórkowej oraz regulują stabilność i średnicę naczyń krwionośnych, poprzez co sprawują kontrolę nad mózgowym przepływem krwi. Perycyty są umocowane w błonie podstawnej warstwy endotelium, podobnie jak w niektórych obszarach bezpośrednio do komórek śródbłonna przy pomocy integryn takich jak $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ oraz N-kadheryny i koneksyny 43. Obecność perycytów jest konieczna dla utrzymania połączeń ścisłych. Brak perycytów prowadzi do rozszczelnienia bariery krew-mózg i pojawiania się licznych krwotoków (Winkler, Bell i Zlokovic, 2011). Kolejną warstwę BBB stanowią astrocyty. Wydzielane przez nie białka sygnałowe takie jak Shh (Sonic Hedgehog), Netryna 1, Ang-1 oraz czynniki wzrostu FGF i GDNF oddziałują na komórki śródbłonna poprzez specyficzne receptory obecne na ich powierzchni. Aktywowane w ten sposób wewnątrzkomórkowe szlaki przekaźnictwa sygnału indukują zmianę poziomu ekspresji białek połączeń ścisłych, takich jak kładyna 5 oraz blokują pojawienie się na endotelium białek adhezyjnych dla leukocytów, pośredniczą również w regulacji obecności VE-kadheryny w AJ wpływając na stopień transportu paracellularnego. Astrocyty stanowią kluczowy składnik BBB, który ze względu na swoje położenie może oddziaływać bezpośrednio z komórkami parenchymy OUN (Abbott, 2002). Astrocyty wydzielają białka, które tworzą ich własną błonę podstawną oddzielającą parenchymę od BBB. Błona ta składa się z innych komponentów niż wytwarzana przez endotelium błona podstawna. Do głównych składników tej błony należą laminina $\alpha 1$ oraz $\alpha 2$, podczas gdy błona komórek śródbłonna zawiera izoformy laminy $\alpha 4$ oraz $\alpha 5$. Obie z współtworzących BBB błon stanowią barierę dla leukocytów podczas procesu ich diapedyzy, jednak ze względu na odmienną kompozycję składników tych błon ich oddziaływanie z komórkami układu odpornościowego ma inny charakter. W rejonie żyłek post kapilarnych pomiędzy błoną podstawną komórek śródbłonna a błoną wytwarzaną przez astrocyty znajduje się przestrzeń periwaskularna wypełniona przez płyn mózgowo-rdzeniowy, nie występuje ona w obszarze naczyń kapilarnych, gdzie dwie wyżej wymienione błony łączą się ze sobą w jedną. Transport związków odżywczych odbywa się głównie w obszarach naczyń kapilarnych, które są zlokalizowane bliżej neuronów mózgu, natomiast migracja komórek układu odpornościowego ma miejsce w rejonie żyłek post kapilarnych, dzięki czemu po wnikięciu komórek immunologicznie czynnych do przestrzeni periwaskularnej, mogą się one kontaktować z obecnymi tam komórkami APC (Yousif, Di Russo i Sorokin, 2013).

1.5.2. Zmiany właściwości BBB na skutek udaru niedokrwienego mózgu

Podczas udaru mózgu, na skutek pojawienia się zatoru w naczyniu krwionośnym dochodzi do obniżenia przepływu krwi w obszarze przez nie zaopatrywanym. Jednocześnie do rejonu tego nie jest dostarczana wystarczająca ilość składników odżywczych i tlenu. Powoduje to niedobór produkowanego ATP (adenozyno-5'-trifosforanu; ang. adenosine triphosphate), napływ ekscytotoksycznego dla neuronów glutaminianu, zaburzenia gradientu jonów, wzrost zakwaszenia tkanki oraz indukcje stresu oksydacyjnego. Stymuluje to przemieszczenie płynu tkankowego do wnętrza komórek prowadząc do powstania cytotoksycznego obrzęku mózgu. W miejscu uszkodzenia wytwarzana jest również duża ilość cytokin prozapalnych i chemokin, które powodują aktywację komórek śródbłonna jak również stymulują napływ komórek układu odpornościowego gospodarza. Już w ciągu kilku pierwszych minut po udarze zachodzą daleko idące zmiany w obszarze mikronaczyń krwionośnych znajdujących się w centrum tego obszaru (Sandoval i Witt, 2008). Aktywowane

tkankowe enzymy proteolityczne takie jak urokinaza, metaloproteinazy i katepsyny trawią składniki macierzy zewnątrzkomórkowej oraz błonę podstawną komórek śródbłonka i astrocytów, stanowiących komponenty BBB. Akumulacja kwasu mlekowego w komórkach śródbłonka powoduje ich obrzęk, co prowadzi do zmniejszenia światła kapilarnych naczyń krwionośnych. W wyniku niedotlenienia w komórkach śródbłonka dochodzi do spadku poziomu ekspresji i zmian lokalizacji białek tworzących połączenia ścisłe, czemu towarzyszy obniżenie oporu elektrycznego warstwy endotelium. Jeżeli zatkane naczynie zostanie udrożnione, dochodzi do jego reperfuzji. Natychmiast po powrocie mózgowego przepływu krwi następuje ostre przekrwienie, co powoduje otwarcie uszkodzonej bariery krew-mózg w związku z silnym wzrostem ciśnienia w układzie oraz częściowym rozpadem połączeń ścisłych. Po pierwszym epizodzie wzrostu przepuszczalności BBB dochodzi do ponownego zamknięcia połączeń ścisłych, ale mechanizm tego procesu nie został do tej pory wyjaśniony. Przypuszcza się, że przyczyną tego jest wzmożona aktywność kurczliwa perycytów otaczających komórki endotelium, które stabilizują przepływ krwi. Po przekrwieniu następuje faza hypoperfuzji uszkodzonego obszaru mózgu trwająca przez kilka kolejnych godzin. Podczas tego procesu obserwuje się kolejny cykl rozpadu i połączenia TJ. Przyczyn hypoperfuzji upatruje się w niedoborze związków odżywczych oraz wciąż postępującej obstrukcji mikronaczyń wywołanej obrzękiem komórek endotelialnych i wypustek stopowatych astrocytów, które tracą kontakt z komórkami śródbłonka (Kunz i Iadecola, 2009). Jednocześnie te same zjawiska mogą stanowić przyczynę ponownego rozpadu TJ. Innymi wymienianymi niekorzystnymi czynnikami są: działanie stresu oksydacyjnego i aktywność proteolityczna enzymów tkankowych. Ostatni cykl rozpadu i odnowy połączeń komórek śródbłonka BBB jest obserwowany w fazie obrzęku wazogenego (Huang i in., 1999). Po kilku dniach od epizodu niedokrwienia, rozpoczyna się proces angiogenezy i przebudowy uszkodzonych naczyń krwionośnych w obszarze uszkodzenia. Aby to się stało konieczne jest rozszczelnienie połączeń ścisłych pomiędzy komórkami śródbłonka. Jednocześnie wciąż aktywne są procesy związane z aktywacją układu odpornościowego gospodarza, które również destabilizują połączenia w warstwie endotelium. W związku z tym wzrasta przepuszczalność BBB, co umożliwia wnikanie makrocząsteczek obecnych we krwi do parenchymy. Skutkuje to wzrostem całkowitej objętości tkanki i w efekcie obrzękiem mózgu (Heo, Han i Lee, 2005). Proces przebudowy naczyń krwionośnych może trwać nawet przez kilka kolejnych tygodni, jednak kończy się nie tylko ponownym złożeniem przerwanych połączeń, ale również uformowaniem nowych TJ pomiędzy komórkami śródbłonka. Istnieje wiele mechanizmów molekularnych przyczyniających się do wzrostu przepuszczalności BBB podczas udaru mózgu. Uszkodzona tkanka wytwarza duże ilości cytokin prozapalnych takich jak TNF α oraz IL1, wolnych rodników oraz czynników wzrostu regulujących proces angiogenezy w tym VEGF. Aktywują one w komórkach śródbłonka kinazy białkowe takie jak: PKC (kinaza białkowa C; ang. protein kinase C), PKA (kinaza białkowa A; ang. protein kinase A), PKG (kinaza białkowa G; ang. protein kinase G), PKT (kinaza białkowa B; ang. protein kinase B), FAK (kinaza płytek przylegania; ang. focal adhesion kinase), PI3K (kinaza 3-fosfatydyloinozytolu; ang. phosphoinositide 3-kinase) oraz SRC (rodzina SRC kinaz tyrozynowych). W ich działaniu pośredniczą następnie mediatory, wśród których można wymienić cykliczne formy nukleotydów (cAMP - cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan; ang. 3',5'-cyclic adenosine monophosphate, cGMP - cykliczny guanozyno-3',5'-monofosforan; ang. cyclic guanosine monophosphate), jony wapnia oraz inne cząsteczki. Mechanizmy aktywowane przez te cząsteczki prowadzą w większości do zmian stanu fosforylacji domen cytoplazmatycznych białek współtworzących połączenia ścisłe (takich jak kładyna i okładyna) oraz przylegające (VE-kadheryna) lub kompleksów białkowych kotwiczących je w błonie. Powoduje to destabilizację komponentów TJ i ich internalizację lub redystrybucję w komórce śródbłonka. Dodatkowo kinazy te wpływają na fosforylację lekkich łańcuchów miozyny (MLC; ang. myosin light chain) zmieniając powinowactwo filamentów miozynowych i aktynowych. Dochodzi do uformowania włókien stresowych aktyny,

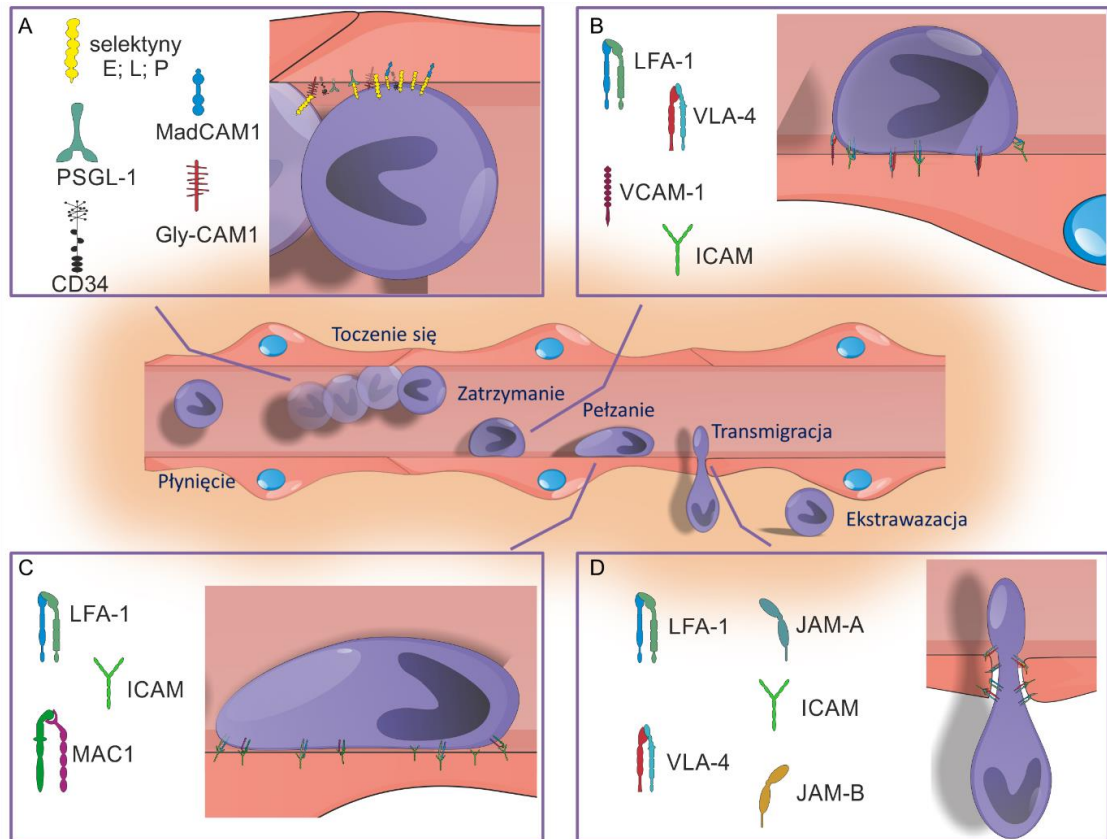
wzrasta aktywność kurczliwa cytoszkieletu komórki, co powoduje obkurczenie komórek śródbłonka i wywołuje wzrost przepuszczalności BBB (Heo, Han i Lee, 2005). Przykładowo w komórkach śródbłonka już podczas pierwszych kilku minut od początku epizodu niedotlenienia wykrywana jest duża ilość związanej z błoną izoformy kinazy PKC, która fosforyluje białka kompleksu ZO. W wyniku tego zjawiska białka te ulegają translokacji z cytoplazmy do jądra komórkowego, nie mogąc już dłużej stabilizować białek połączeń ścisłych w błonie komórkowej (Sandoval i Witt, 2008). Należy także pamiętać o wspomnianych wcześniej, wydzielanych przez tkankę, enzymach proteolitycznych, które trawią elementy ECM (macierz zewnątrzkomórkowa; ang. extracellular matrix), łączące komórki ze sobą, przez co powodują dysocjację poszczególnych elementów BBB. Aktywowane w odpowiedzi na uszkodzenie komórki endotelium, astrocyty jak również inne komórki OUN wydzielają duże ilości cytokin prozapalnych i innych czynników stanowiących chemoatraktanty dla leukocytów (Candelario-Jalil i in., 2007). Wysokie stężenie IL-1, TNF- α oraz MCP-1 (białko chemotaktyczne dla monocytów; ang. monocyte chemoattractant protein 1) prowadzi do rozszczelnienia połączeń warstwy endotelium na skutek zaniku i redystrybucji VE-kadheryny, okludyny, Kludyny, katenin i białek ZO w mechanizmach opisanych powyżej, ponadto powoduje wzrost ekspresji innych białek adhezyjnych obecnych w błonie komórek śródbłonka (Dimitrijevic, Stamatovic, Keep i Andjelkovic, 2006). Indukcja dużej ilości cząsteczek ICAM, selektyn oraz białek JAM umożliwia leukocytom transmigrację z krwioobiegu do parenchymy mózgu.

1.5.3. Proces diapedezy leukocytów w stanach patologicznych OUN

W stanach patologicznych OUN, takich jak np. udar mózgu, dochodzi do masywnego napływu komórek układu odpornościowego do parenchymy mózgu. Przejście leukocytów ze światła naczynia krwionośnego do tkanki jest procesem wieloetapowym. Składa się on z sekwencji zdarzeń, którą inicjuje przejściowy kontakt krążących w krwioobiegu leukocytów z komórkami śródbłonka wyścielającymi naczynie krwionośne. W procesie tym pośredniczą głównie białka adhezyjne z rodziny selektyn. Selektyny stanowią białka transbłonowe wiążące specyficzne reszty cukrowe. Ze względu na pochodzenie wyróżnia się trzy główne kategorie selektyn, oznaczane odpowiednio literami E – epithelialne, L- leukocytarne oraz P – płytkowe (Cytobiochemia. Biochemia niektórych struktur komórkowych, 2018). Wszystkie z nich pośredniczą w pierwszym etapie kontaktu pomiędzy leukocytami a komórkami śródbłonka, a ich głównymi ligandami obecnymi na powierzchni leukocytów są: glikozylowane białko PSGL-1 (ligand P selektyny; ang. P selectin ligand), MadCAM-1 (cząsteczka adhezji komórkowej będąca adresyną błon śluzowych; ang. mucosal addressin cell adhesion molecule-1), Gly-CAM1 (cząsteczka adhezji komórkowej zależna od glikozylacji; ang. glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1) GDNF oraz CD34 (tetraspanina 34). Siła wiązania się selektyn z ich ligandami wzrasta w obecności sił ścinania. Powstają one podczas przepływu krwi, gdy poruszająca się ciecz wywiera nacisk na ścianę naczynia krwionośnego. Dzięki ich obecności płynąca komórka naprzemiennie łączy się i oddziela od komórek śródbłonka, wytracając stopniowo swoją prędkość. Etap ten nazywany jest toceniem się komórek. Alternatywnie oddziaływanie to zachodzi również poprzez wiązanie obecnych na leukocytach integryn zawierających podjednostkę $\alpha 4$ z białkami z rodziny immunoglobulin jak VCAM-1 (cząsteczka adhezji komórkowej naczyń 1; ang. vascular cell adhesion molecule 1) oraz MadCAM-1 (Ley, Laudanna, Cybulsky i Nourshargh, 2007). Integryny stanowią jedną z najistotniejszych klas białek adhezyjnych, które są zaangażowane w wiele etapów procesu ekstrakwazacji. Są one zbudowane z dwóch niekowalencyjnie połączonych podjednostek. Składają się one z większego łańcucha α oraz mniejszego β . Dotychczas wyróżniono 14 możliwych wariantów podjednostki α oraz 8 podjednostki β . Część z podjednostek α może asocjować tylko z jedną podjednostką β , jednak istnieją również takie jak np. $\alpha 4$, $\alpha 6$ oraz αv , które mogą się łączyć z kilkoma rodzajami podjednostki β . W budowie integryn można wyróżnić globularną główkę i dwie odnogi przechodzące przez błonę komórkową. Domena cytoplazmatyczna integryn wchodzi w interakcje z

cytoszkieletem komórki (Cytobiochemia. Biochemia niektórych struktur komórkowych, 2018). Integryny takie jak LFA-1 (integryna α L β 2; antygen związany z czynnością limfocytów; ang. lymphocyte function-associated antigen 1) oraz VLA-4 (α 4 β 1; antygen bardzo późny 4; ang. very late antygen 4) stanowią białka adhezyjne, które umożliwiają kolejny etap procesu diapedezy leukocytów, czyli zatrzymanie się toczącej się komórki na powierzchni śródbłonka. Tocząca się w świetle naczynia komórka, pod wpływem chemokin takich jak na przykład CXCL12, wydzielanych przez komórki śródbłonka wiąże się z obecnymi na komórkach endotelium receptorami. Prowadzi to do aktywacji receptorów związanych z białkami G obecnych w cytoplazmie komórek układu odpornościowego. Inicjuje to rozpoczęcie wewnątrzkomórkowej kaskady sygnałowej stanowiącej bodziec dla integryn obecnych na powierzchni leukocytów do aktywacji, czyli zmiany konformacji zwiększającej ich powinowactwo do ligandów, jak również do rozpoczęcia tworzenia klastrów (Herter i Zarbock, 2013). Po aktywacji integryna VLA-4 wiąże się głównie z białkiem VCAM-1, natomiast LFA-1 z receptorami ICAM-1 (cząsteczka adhezji międzykomórkowej; ang. intercellular adhesion molecule 1) i ICAM-2 (ang. intercellular adhesion molecule 2). Połączenia te zapewniają związanie toczących się leukocytów z warstwą komórek śródbłonka, co prowadzi do zatrzymania się komórek. Po związaniu integryn z ligandami zmienia się stan fosforylacji ich domen cytoplazmatycznych. Przyłączane są do nich białka, takie jak paksylina łącząca się z podjednostką α 4, co umożliwia integrynom wejście w oddziaływania z kompleksem Arf GAPs (białko aktywujące GTPazę z rodziny Arf; ang. ADP-ribosylation factor GTPase activating proteins) zaangażowanym w mechanizm transportu błonowego i przebudowy cytoszkieletu aktywnego komórki. Prowadzi to do zahamowania Arf GAPs, a tym samym procesów przez niego kontrolowanych w obszarze, w którym zlokalizowane są integryny, co zapewnia stabilizację i wzmocnienie siły wiązania leukocytów do komórek śródbłonka. Pośrednio reguluje to również migrację komórek immunologicznie czynnych, gdyż wiodący biegun błony komórkowej wyznaczający kierunek dalszego przemieszczania się komórki znajduje się w sektorze, w którym nie doszło do interakcji integryn z ich ligandami, a więc w rejonie, w którym kompleks Arf GAPs wciąż jest aktywny. (Randazzo i Hirsch, 2004; Ley i in., 2007). Migracja leukocytów wzdłuż ściany naczynia krwionośnego po ich zatrzymaniu nazywana jest pełzaniem. Ten proces zachodzi dzięki oddziaływaniu białek LFA-1, MAC-1 (integryna CD11b/CD18; ang. macrophage 1), ICAM-1 oraz ICAM-2, a jego celem jest znalezienie optymalnej przestrzeni do przejścia leukocytów przez warstwę komórek śródbłonka. Wymaga to przekroczenia bariery tworzonej przez połączenia ściste i przylegające pomiędzy komórkami endotelialnymi. Jak już wcześniej wspomniano jednym z głównych białek budujących te połączenia jest VE-kadheryna. Jej dystrybucja wzdłuż komórek śródbłonka tworzących naczynia krwionośne w pobliżu uszkodzonej tkanki ulega zmianie, stąd leukocyty pełzają w naczyniu do obszarów, w których jej nagromadzenie jest względnie małe, aby tam rozpocząć proces transmigracji (Ley i in., 2007). W pierwszym etapie transmigracji dookoła komórki powstaje pierścień stworzony przez ściste połączenia pomiędzy integryną LFA-1 a białkiem ICAM-1 oraz receptorem VLA-4 i jego ligandem VCAM-1 określane mianem struktury dokującej. W następnym etapie komórki śródbłonka wytwarzają bogate w wyżej wymienione receptory wypustki otaczające migrujące leukocyty. Transmigracja polega na przekroczeniu przez leukocyt warstwy endotelium dzięki przejściu przez połączenia pomiędzy komórkami śródbłonka na drodze paracelluralnej/międzykomórkowej lub bezpośrednio przez komórkę śródbłonka – transcelluralnie/przekomórkowo. Znacznie częściej obserwuje się przejście leukocytów przy udziale ścieżki paracelluralnej. Połączenie białka ICAM1 z cząsteczką MAC1 w rejonie transmigracji uruchamia wewnątrzkomórkową kaskadę sygnałową komórek śródbłonka powodującą wzrost aktywności kurczliwej łańcuchów miozyny, na skutek, czego dochodzi do częściowego rozszczelnienia połączeń pomiędzy komórkami śródbłonka, związanego z rozpadem połączeń VE-kadheryny. Podczas tego procesu leukocyty wytwarzają wypustki, które ściśle łączą się z komórkami śródbłonka, na powierzchni, których obserwuje się wzrost ekspresji specyficznych ligandów. Integryny

obecne na leukocytach łączą się z białkami JAM (JAM-A z LFA-1 oraz JAM-B z VLA-4) oraz ICAM1 i ICAM2 natomiast białka PECAM-1 (cząsteczka adhezji komórkowej płytek i śródbłonka; ang. platelet endothelial cell adhesion molecule) i CD99 tworzą interakcje homofilowe (połączenia PECAM-1 z PECAM-1 oraz CD99 z CD99). Sekwencyjne powstawanie tych połączeń powoduje, że leukocyty przedostają się przez przestrzeń pomiędzy komórkami śródbłonka.



Ryc. 4. Schemat procesu ekstrawazacji leukocytów z uwzględnieniem głównych typów białek adhezyjnych zaangażowanych w procesy (A) toczenia się, (B) zatrzymania, (C) pełzania i (D) transmigracji.

W przypadku transmigracji na drodze transcellularnej, zachodzącej przez cytoplazmę komórek śródbłonka, proces ten rozpoczyna się od uformowania w obszarze cienkiej warstwy komórek endothelialnych wypustek obejmujących leukocyt. Zlokalizowane powierzchniowo na komórkach śródbłonka białko ICAM-1 przemieszcza się do obszarów błony komórkowej graniczącej z leukocytem bogatej w F-aktynę i kaweole. W rejonie tym uformowany zostaje kanał kaolinowo-aktynowy umożliwiający przejście leukocytów (Schnoor, Alcaide, Voisin i van Buul, 2015). Po pokonaniu warstwy endothelium komórki immunologicznie czynne muszą przejść przez błonę podstawną naczyń krwionośnego. Głównymi składnikami błony są laminina i kolagen IV. Leukocyty do swojej dalszej migracji wykorzystują regiony, w których ekspresja tych białek jest względnie niska. Komórki przemieszczają się do nich podążając prawdopodobnie za gradientem wytwarzanych przez tkankę czynników chemotaktycznych dzięki interakcji pomiędzy obecną na ich powierzchni integryną $\alpha 6 \beta 1$ a lamininą. W kolejnym etapie transmigracji następuje trawienie wytworzonej przez astrocyty błony ograniczającej wejście do tkanki przy użyciu wydzielanych przez leukocyty metaloproteinaz MMP-2 (metaloproteaza macierzy pozakomórkowej 2; ang. matrix metalloproteinases 2) oraz MMP-9 (metaloproteaza macierzy pozakomórkowej 9; ang. matrix metalloproteinases 9). Po ukończeniu tego etapu leukocyty przedostają się do parenchymy mózgu, tym samym kończąc proces ekstrawazacji. Całość procesu diapedezy leukocytów zajmuje około 20 minut (Schnoor i in., 2015; Ley i in., 2007).

1.5.4. Migracja i ekstrawazacja mezenchymalnych komórek macierzystych po ich transplantacji do łożyska naczyniowego

Transplantacja MSCs najczęściej odbywa się na drodze podania do układu naczyniowego, co powoduje, że przeszczepiane komórki, aby przedostać się do uszkodzonych struktur muszą przejść przez ścianę naczynia krwionośnego. Proces migracji i ekstrawazacji MSCs nie został dotychczas dobrze poznany. Niewiele jest prac opisujących jego poszczególne etapy, jednak wydaje się, że charakteryzuje się on pewną analogią do wyżej opisanej diapedezy leukocytów (Rüster i in., 2006). Przypuszcza się, że sam etap zatrzymania podanych systemowo MSCs w obszarze uszkodzenia może być zjawiskiem pasywnym, wynikającym ze względnie dużego rozmiaru podanych komórek, które zatykają światło naczyń krwionośnych o niewielkiej średnicy – takich jak naczynia kapilarne (Leibacher i Henschler, 2016). Niemniej jednak na powierzchni MSCs obecne są receptory dla cząsteczek chemotaktycznych takie jak CXCR4 (receptor dla chemokin z rodziny CXC 4; ang. CXC chemokine receptor type 4) oraz niektóre receptory z grupy wiążącej chemokiny podrodziny C-C (CCR; receptor chemokin z motywem CC; ang. CC chemokine receptor), które mogą pośredniczyć w procesie ukierunkowanej migracji i rekrutacji komórek podanych systemowo do obszaru uszkodzenia. Dotychczas udokumentowano znaczenie białka CCR2 w migracji dożylnie podanych MSCs do uszkodzonego mięśnia sercowego, jak również rolę oddziaływań receptora CXCR4 i jego liganda SDF-1 dla ukierunkowania przemieszczenia się komórek do mózgu zwierząt po epizodzie niedotlenienia (Yu i in., 2015; Guo i in., 2013). Niestety poza pojedynczymi przykładami udział procesu chemotaksji w lokalizacji narządowej podanych systemowo komórek nie został dotychczas odpowiednio zweryfikowany. Po przedostaniu się MSCs do obszaru docelowego, gdzie komórki te będą podlegały transmigracji, ulegają one zatrzymaniu. Jednak nie posiadają one na swojej powierzchni selektyn, tak więc mechanizm ich dokowania jest inny niż ten obserwowany u leukocytów. MSCs charakteryzuje wysoka ekspresja białka CD44 – jednego z głównych ligandów selektyn, aczkolwiek ze względu na brak fukozytacji nie jest on funkcjonalny (Brooke, Tong, Levesque i Atkinson, 2008; Sackstein i in., 2008). Zakładając więc, że zjawisko wychwytu komórek z krwioobiegu jest procesem aktywnym, proces migracji z łożyska naczyniowego do tkanki musi mieć inne podłoże molekularne. Wskazuje się między innymi na oddziaływanie integryn z receptorami z rodziny immunoglobulin, które także u leukocytów mogą stanowić białka zaangażowane w alternatywny mechanizm toczenia się komórek. Na powierzchni MSCs są obecne podjednostki integryn takich jak: $\beta 1$, $\beta 2$, $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ oraz αV . Jeśli chodzi o ekspresję podjednostki $\alpha 4$ w literaturze można znaleźć sprzeczne doniesienia. Zuk (Zuk i in., 2002), Orciani (Orciani i in., 2010) i Pittenger (Pittenger i in., 1999) w swoich pracach podają, że MSCs nie wykazują ekspresji podjednostki $\alpha 4$, podczas gdy inni autorzy twierdzą, iż białko to jest obecne (Gronthos i in., 2001) i aktywnie uczestniczy w adhezji MSCs do komórek śródbłonna poprzez oddziaływanie z receptorem VCAM1 (Steingen i in., 2008; Rüster i in., 2006). Niektóre badania wykazały, że obecność białka $\alpha 4$ na MSCs może być zależna od źródła izolacji komórek, a w przypadku MSCs uzyskanych ze szpiku kostnego poziom jego ekspresji jest niewystarczający, aby mogło ono w sposób funkcjonalny łączyć się z VCAM-1 (Brooke i in., 2008). Odsetek szpikowych MSCs wykazujących ekspresję podjednostki $\alpha 4$ w zależności od opublikowanych wyników badań różnych autorów mieści się w zakresie od 0,5 % (Xiao i in., 2012) do 48 % (Rüster i in., 2006). Przyczyny zaobserwowanych rozbieżności mogą być związane z różnym etapem cyklu komórek MSCs, ich heterogennością zależną od dawcy i różnicami w warunkach hodowli *in vitro*, jak np. poziom tlenu (Choi i in., 2016) lub gęstość komórek, które mają ogromny wpływ na profil ekspresji białek adhezyjnych (Nishihira i in., 2011). Dotychczas stwierdzono, że podjednostka $\beta 1$ odgrywa istotną rolę w procesie ustanowienia kontaktu pomiędzy przepływającymi MSCs, a komórkami śródbłonna. Zastosowanie przeciwciał specyficznie blokujących integryny lub białka VCAM-1 obecne na komórkach śródbłonna powoduje redukcję liczby zatrzymujących się komórek jak również ogranicza ich migrację do uszkodzonego mięśnia sercowego w badaniach *in vivo*. Wskazuje to, na zaangażowanie tych

receptorów w mechanizmy kontrolujące proces wychwytu MSCs z krwioobiegu (Aldridge i in., 2012; Ip i in., 2007). Niewiele natomiast wiadomo o znaczeniu pozostałych integryn w inicjacji kontaktu MSCs z warstwą endotelium. W przypadku leukocytów związanie receptorów takich jak LFA-1 oraz VLA-4 z ich ligandami jest kluczowym etapem umożliwiającym utworzenie stabilnego połączenia z komórkami śródbłonka. Obecności receptorów LFA-1 oraz VLA-4 nie wykryto na powierzchni komórek MSCs (Brooke i in., 2008). Z dotychczasowych badań wynika, że po zainicjowaniu kontaktu MSCs z komórkami śródbłonka następuje polaryzacja w obrębie cytoplazmy MSCs. Zjawisko to zachodzi dzięki aktywacji wcześniej wspomnianego receptora CCR2. Koniec cytoplazmatyczny tego receptora jest związany z białkiem adaptorowym o nazwie FROUNT, które uruchamia kaskadę sygnałową fosfolipazy PI3K. Prowadzi to do reorganizacji cytoszkieletu i wytworzenia przez komórkę macierzystą wypustek. Powyższy mechanizm została najpierw opisany u podlegających chemotaksji monocytów, a następnie zidentyfikowany również u MSCs podczas ich migracji do uszkodzonego mięśnia sercowego (Terashima i in., 2005; Belema-Bedada i in., 2008). Wykazano, że MSCs po związaniu do warstwy endotelium wchodzą w bliski kontakt z komórkami śródbłonka, co prowadzi do zaniku połączeń ścisłych w warstwie endotelium (Schmidt i in., 2006). Oprócz opisanych dla leukocytów mechanizmów transmigracji przez endotelium, takich jak szlaki para- i transcellularny (Teo i in., 2012), dla MSCs zaproponowano istnienie drogi alternatywnej nazywanej angiopellozą (ang. angiopellosis). Angiopelloza w przeciwieństwie do diapedezy leukocytów jest procesem, w którym komórki śródbłonka aktywnie przenoszą pasywne MSCs ze światła na zewnętrzną stronę ściany naczynia krwionośnego. Podczas tego procesu transportowane komórki zachowują swój okrągły kształt. Co więcej, zjawisko to umożliwia przenoszenie komórek w grupach (Allen i in., 2017). Na podstawie obserwacji procesu przejścia MSCs przez warstwę komórek śródbłonka w warunkach *in vitro* zaproponowano również model, w którym MSCs nie podlegają procesowi migracji wzdłuż naczynia krwionośnego, natomiast są otaczane przez strukturę dokującą, a następnie wytwarzają bąblowate wypustki w wielu kierunkach. Dzięki tym strukturom MSCs wchodzą w dalszy kontakt z komórkami śródbłonka i przekraczają ich warstwę poprzez rozszczelnione połączenia ścisłe pomiędzy nimi lub przechodząc przez ich cytoplazmę. Proces ten jest zbliżony dla ekstrawazacji przerzutujących komórek nowotworowych oraz komórek zarodkowych niż diapedezy leukocytów (Teo i in., 2012). Przejście MSCs przez śródbłonek na drodze paracelluralnej wydaje się być zależne od aktywności kinazy PI3K, ponieważ jej zablokowanie hamuje transmigrację komórek, jednak oddziaływania pomiędzy poszczególnymi receptorami podczas tego procesu nie zostały dotychczas opisane (Lin i in., 2013). Kolejną przeszkodę na drodze transmigracji komórek stanowi błona podstawna naczynia krwionośnego, której przekroczenie wymaga strawienia jej składników przez enzymy proteolityczne. Badania *in vitro* pokazują, że MSCs są w stanie dokonać inwazji modelu sztucznej błony podstawnej, a kluczową rolę w tym procesie odgrywa metaloproteinaza 2 (De Becker i in., 2007). Wykazano, że zablokowanie ekspresji MMP2 obniża liczbę MSCs migrujących przez komory migracyjne pokryte białkami ECM nawet o 70 % (Ries i in., 2007). Według niektórych badaczy MSCs wytwarzają MMP-2, natomiast druga z głównych metaloproteinaz wydzielanych przez leukocyty - MMP-9 nie jest u nich wykrywana (Steingen i in., 2008). Innym enzymem proteolitycznym, który wydaje się odgrywać istotną rolę w procesie transmigracji MSCs jest urokinaza, która została zidentyfikowana w wypustkach tych komórek podczas ich przejścia przez warstwę endotelium *in vitro* (Krstić i in., 2015). Jednak znaczenie działania tych proteaz podczas transmigracji MSCs nie zostało dotychczas potwierdzone w badaniach *in vivo*.

1.6. Techniki zwiększające zasiedlanie obszaru uszkodzenia przez mezenchymalne komórki macierzyste podane systemowo

W świetle aktualnej wiedzy wydaje się, że transplantacja komórek macierzystych stanowi bardzo obiecujący kierunek dla dalszego rozwoju medycyny regeneracyjnej jednak wydajność migracji jak i zasiedlania uszkodzonych narządów przez podane przeznaczeniowo MSCs jest niska a mechanizmy

kierujące powyższymi procesami nie zostały do tej pory dobrze poznane. Zagadnienie zwiększenia napływu i zagnieżdżania się przeszczepianych komórek w obrębie zmienionych chorobowo narządów może stanowić kluczowy czynnik decydujący o powodzeniu terapii komórkowej. Dotychczas wypróbowano kilka rodzajów strategii mających na celu zwiększenie migracji MSCs do określonych miejsc w tkance i zatrzymanie komórek podanych egzogennie.

1.6.1. Zmiana warunków hodowli *in vitro* (ang. pre-treatment)

Standaryzacja protokołów hodowli komórek *in vitro* ma za zadanie optymalizację warunków tak, aby komórki przed przeszczepem posiadały właściwości ich natywnych ekwiwalentów obecnych w organizmie. Nawet niewielkie różnice w zawartości tlenu w otoczeniu, gęstości wysiania komórek oraz składzie pożywki hodowlanej mogą wpływać na fenotyp MSCs, włączając w to zmiany w poziomie ekspresji białek adhezyjnych (Nishihira i in., 2011). Tak duża wrażliwość komórek na nawet niewielkie zmiany warunków panujących w ich otoczeniu została wykorzystana w celu zaindukowania u nich ekspresji receptorów i enzymów uczestniczących w migracji i ekstrawazacji komórek poprzez suplementację zawiesiny, w której są one utrzymywane lub modyfikację warunków hodowli. W związku z udowodnionym wpływem CXCR4 na ukierunkowaną migrację MSCs w wielu dotychczasowych badaniach, stymulacja nad-ekspresji właśnie tego receptora stanowiła cel niektórych prowadzonych *in vitro* manipulacji (Yu i in., 2015). Indukcję lub zwiększenie ekspresji CXCR4 można uzyskać uzupełniając pożywkę hodowlaną mieszaniną cytokin takich jak SCF (czynnik komórek macierzystych; ang. stem cell factor), IL-3, IL-6, HGF (czynnik wzrostu hepatocytów; ang. hepatocyte growth factor) oraz ligandu flt-3 (ligand kinazy tyrozynowej; ang. fms-related tyrosine kinase 3 ligand) lub przy zastosowaniu dodatku IGF-1, IL-1 β i IFN γ (Shi i in., 2007; Li i in., 2007; Fan i in., 2012). Ponadto okazało się, że hodowla komórek w obecności kwasu walproinowego wzmacnia ekspresję CXCR4 oraz MMP-2 (Marquez-Curtis i Janowska-Wieczorek, 2013). Innym podejściem eksperymentalnym może być hodowla komórek w warunkach hipoksji. Badania pokazują, że obniżenie stężenia tlenu powoduje wzrost syntezy CXCR4 oraz zmienia profil wydzielanych metaloproteinaz (Yu i in., 2013; Liu i in., 2010a). Uzyskanie odpowiedniego poziomu metaloproteinaz i liczby receptorów dla chemokin jest także możliwe poprzez wysiewanie komórek w określonej gęstości. Komórki utrzymane w warunkach niskiej konfluencji wydzielają znacznie mniejsze ilości inhibitora metaloproteinaz TIMP-3 (tkankowy inhibitor metaloproteinaz 3; ang. tissue inhibitor of metalloproteinases 3) niż komórki rosnące gęsto i wydajniej przeprowadzają one proces inwazji modelu *in vitro* błony komórkowej (De Becker i in., 2007). MSCs z nad-ekspresją receptora CXCR4 zaindukowaną poprzez zmianę warunków hodowli wykazują wzmożoną migrację w kierunku gradientu czynnika SDF-1, który jest specyficznym ligandem dla CXCR4 oraz zwiększonym gromadzeniem się w obszarze uszkodzenia w modelu zapalenia jelita, nerek oraz szpiku kostnego u myszy po napromieniowaniu (Shi i in., 2007; Li i in., 2007; Fan i in., 2012; De Becker i in., 2007). Podobnie 60-cio minutowa inkubacja MSCs w pożywce zawierającej białko SDF-1 pozwala zwiększyć zasiedlanie obszaru uszkodzonego mięśnia sercowego przez podane systemowo tak przygotowane komórki (Pasha i in., 2008). Zmiana profilu ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w proces migracji MSCs poprzez manipulację warunkami hodowli komórek *in vitro* jest niewątpliwie jedną z najprostszych technicznie metod, jednak w ten sposób trudno jest uzyskać efekt zmian oczekiwanych przez badacza. Zakres wpływu podawanej substancji oraz zmian warunków hodowli jest dużo szerszy i niekoniecznie korzystnie wpływa na właściwości modyfikowanych komórek. W związku z możliwymi efektami ubocznymi, zastosowanie określonych procedur eksperymentalnych wymaga bardzo dogłębnej analizy fenotypu i funkcjonowania zmodyfikowanych komórek.

1.6.2. Modyfikacje genetyczne komórek

Jedną z najczęściej stosowanych technik zmian fenotypu komórek jest wprowadzenie do nich wektorów ekspresyjnych kodujących określony produkt białkowy. Ich nośnikami bardzo często są

wirusy pozbawione sekwencji odpowiedzialnych za namnażanie i zjadliwość. Pozwala to na wykorzystanie naturalnej zdolności wirusów do przeprowadzania inwazji komórek eukariotycznych oraz minimalizację ryzyka uszkodzenia organizmu. Wektory wirusowe można podzielić na te wbudowujące się w genom gospodarza pochodzące z rodziny Retroviridae oraz rodzaju Lentivirus i AAV (wirusy związane z adenowirusami; ang. adeno-associated virus) a także wirusy nieintegrujące się z DNA zaliczane do rodzin *Sendai* i Adenoviridae (Genetyka molekularna - Piotr Węgleński PWN, 2018). Główną różnicą w użyciu nośników opartych o te dwie grupy wirusów jest czas ekspresji wprowadzonego transkryptu. W przypadku wirusów integrujących się z genomem wprowadzony do komórki kwas nukleinowy jest trwale obecny, podczas gdy występowanie transgenu po zastosowaniu wirusów niewbudowujących się w DNA jest przejściowe. Użycie wektorów wirusowych dla uzyskania transfekcji MSCs jest możliwe ze względnie wysoką, aczkolwiek zróżnicowaną wydajność szacowaną na 35-100 % komórek wykazujących ekspresję wprowadzonego konstrukt (McGinley i in., 2011; Knaän-Shanzer i in., 2005). Transdukcja wektorem retrowirusowym zawierającym sekwencję kodującą receptor CXCR4 została wykorzystana dla uzyskania MSCs o zwiększonym potencjale do migracji w kierunku gradientu SDF-1, co pozwoliło na wzmoczenie zasiedlania przez tak zmodyfikowane komórki szpiku kostnego po ich przeszczepie (Bobis-Wozowicz i in., 2011). Podobnie nad-ekspresja podjednostki $\alpha 4$ receptora VLA-4 została z powodzeniem zaindukowana w MSCs po wprowadzeniu nośnika adenowirusowego kodującego tę część cząsteczkę, co zwiększyło stopień kolonizacji szpiku kostnego myszy przez podane komórki (Kumar i Ponnazhagan, 2007). Duża wydajność omawianej metody jest jej niewątpliwą zaletą, natomiast technika ta niesie ze sobą ryzyko związane z losowym miejscem wbudowywania się nośnika wirusowego w materiał genetyczny biorcy, co może zapoczątkować zjawisko insercyjnej mutagenyzy. Dodatkowo w wyniku wykrycia obecności cząsteczek wirusa może dojść do uruchomienia odpowiedzi immunologicznej organizmu gospodarza (Bessis, GarciaCozar i Boissier, 2004). Istnieje wiele alternatywnych, niewirusowych metod wprowadzania cząsteczek kwasów nukleinowych do komórek hodowanych *in vitro*, jednak charakteryzują się one niższą wydajnością. Najczęściej stosowanymi są techniki oparte o transfekcję cząsteczkami DNA zawartymi w plazmidzie, który może zawierać własną sekwencję promotorową. Dzięki temu geny przez niego kodowane mogą podlegać transkrypcji niezależnie od procesów związanych z DNA gospodarza, a plazmid taki nazywany jest plazmidem ekspresyjnym. Ewentualnie może on wbudowywać się w genom gospodarza, co wymaga transportu do jądra komórkowego. DNA plazmidowe nieintegrujące się może z czasem zanikać gdyż liczba jego kopii w komórce ulega redukcji przy każdym kolejnym podziale mitotycznym, natomiast ekspresja cząsteczek DNA integrujących się jest trwała, jednak ponownie pojawia się ryzyko insercyjnej mutagenyzy (Genetyka molekularna - Piotr Węgleński PWN, 2018). Alternatywnie, do komórek można wprowadzić również cząsteczki miRNA (mikro RNA; ang. micro RNA), które wyciszają ekspresję genów łącząc się z komplementarnym do nich mRNA (informacyjny RNA; ang. messenger RNA) obecnym w cytoplazmie komórek, tym samym blokując proces jego translacji (Guzman-Villanueva i in., 2012). Istnieje także możliwość wprowadzenia do komórek mRNA, co umożliwi bardzo szybkie otrzymanie produktu białkowego, ponieważ mRNA nie wymaga translokacji do jądra komórkowego i przeprowadzenia procesu transkrypcji, jednak uzyskana tą metodą ekspresja określonego białka ma charakter przejściowy. W kwestii zastosowań klinicznych bardzo dużą zaletą technik opartych na wprowadzeniu do komórek cząsteczek RNA (kwas rybonukleinowy; ang. ribonucleic acid) jest brak ryzyka wystąpienia procesu insercyjnej mutagenyzy, gdyż nie wbudowują się one w materiał genetyczny biorcy (Wiehe i in., 2013). Plazmidy oraz natywne cząsteczki DNA, miRNA oraz mRNA mogą być wprowadzane do MSCs przy użyciu wielu metod fizycznych oraz chemicznych. Elektroporacja stanowi przykład techniki fizycznej, w której komórki są poddawane działaniu impulsów zewnętrznego pola elektrycznego, co powoduje uformowanie w ich błonie komórkowej mikroporów. Umożliwia to napływ kwasów nukleinowych zawartych w

otaczającym komórki środowisku do ich cytoplazmy, ponieważ ze względu na swój ujemny ładunek elektryczny zawieszane w roztworze wodnym cząsteczki RNA i DNA przemieszczają się w kierunku pozytywnie naładowanej elektrody – anody, tym samym napływając do wnętrza komórek przez otwory powstałe w ich błonie komórkowej. Modyfikacjami techniki elektroporacji są mikroporacja, w której działaniu prądu poddawane są pojedyncze komórki, co zwiększa kontrolę nad przebiegiem całego procesu oraz nukleofekcja gdzie kwas nukleinowy jest dostarczany bezpośrednio do jądra komórkowego. Obie te techniki są mniej szkodliwe dla komórek i były stosowane z powodzeniem do modyfikacji MSCs z wydajnością wyższą niż elektroporacja (Lim i in., 2010; Nakashima i in., 2005). Kolejnym przykładem fizycznej techniki transfekcji jest sonotransfekcja, gdzie do rozszczelnienia błony komórkowej wykorzystuje się działanie ultradźwięków, a cząsteczki kwasu nukleinowego przedostają się do wnętrza komórek przez powstałe pod ich wpływem otwory (Otani i in., 2009). W metodzie mikroiniekcji do tego celu wykorzystuje się igły, którymi nakłuwane są pojedyncze komórki, a następnie wstrzykiwany jest kwas nukleinowy. W ten sposób czynnik transfekcyjny można wprowadzić do cytoplazmy lub bezpośrednio do jądra komórkowego (Han i in., 2008). Jednym z przykładów zastosowania metody fizycznej transfekcji u MSCs było wprowadzenie cząsteczek DNA poprzez elektroporację dla wywołania nad-ekspresji receptora CXCR4. Proces ten przebiegał z wydajnością 80 %, co spowodowało wzmocnienie migracji transfekowanych komórek do obszaru zajmowanego przez nowotwór po domózgowym ich podaniu do półkuli kontralateralnej w stosunku do zmiany w modelu glejaka u myszy (Park i in., 2011). Podobnie wzmocnienie migracji MSCs w kierunku gradientu SDF-1 uzyskano dzięki nukleofekcji mRNA kodującym CXCR4, która została z sukcesem przeprowadzona u 93 % komórek (Wiehe i in., 2013). Należy jednak pamiętać, że wszystkie techniki fizyczne transfekcji wymagają przerwania ciągłości błony komórkowej modyfikowanych komórek, aby umożliwić wnikanie czynnika transfekcyjnego, co jest związane z ich uszkodzeniem i obniżeniem przeżywalności (Lim i in., 2010). Ograniczenie śmiertelności komórek może być uzyskane dzięki minimalizacji obszaru uszkodzenia, tak jak ma to miejsce w technice mikroiniekcji, jednak metoda ta wymaga nakłuwania pojedynczych komórek, co znacząco wydłuża proces przeprowadzania procedury i uniemożliwia wykonywanie badań wielkoskalowych. Alternatywą dla technik fizycznych są charakteryzujące się lepszą przeżywalnością komórek, ale również mniej wydajne metody chemiczne, do których zalicza się techniki oparte na wykorzystaniu dodatnio naładowanych cząsteczek polimerów, białek, polisacharydów i lipidów, które mają zdolność do wiązania się z kwasami nukleinowymi i ułatwiają komórkom ich internalizację. Jedną z często stosowanych w tym celu metod chemicznych jest technika lipofekcji, która wykorzystuje możliwość zamknięcia kwasów nukleinowych w liposomach. Po zawieszeniu DNA lub RNA w roztworze wodnym tworzą one kompleksy z liposomami dzięki przeciwstawnemu ładunkowi powierzchniowemu tych cząsteczek. Następnie kompleksy te dzięki oddziaływaniu elektrostatycznemu pomiędzy dodatnio naładowanymi liposomami a ujemnie naładowaną błoną komórkową są w łatwy sposób „pobierane” przez komórki. Lipofekcja została wykorzystana do wprowadzenia do MSCs plazmidu kodującego transglutaminazę tkankową, która może działać jak koreceptor zwiększający powinowactwo integryn do białek macierzy zewnątrzkomórkowej takich jak fibronektyna. Zmodyfikowane w ten sposób komórki wykazywały wzmoczoną zdolność do migracji oraz adhezji *in vitro* na powierzchniach pokrytych fibronektyną oraz w większym stopniu zasiedlały obszar uszkodzenia w modelu niedokrwienia mięśnia sercowego u szczurów (Akimov, Krylov, Fleischman i Belkin, 2000; Song i in., 2007). MSCs są w literaturze opisywane, jako komórki odporne na działanie chemicznych technik transfekcji. W komórkach tych po wprowadzeniu cząsteczek DNA uzyskuje się jedynie około 2-35 % komórek podlegających modyfikacji (Park, Suryaprakash, Lao i Leong, 2015). Wyższą wydajność sięgającą 80-90 % obserwowano wprowadzając do MSCs cząsteczek mRNA przy użyciu lipofekcji. Wyniki takie uzyskano między innymi stosując lipofekcję MSCs mRNA kodującym receptor CXCR4 (Rejman i in., 2010). Jak dotąd technika ta

nie była dotychczas powszechnie stosowana w celu zwiększenia zdolności zasiedlania i migracji MSCs do rejonu uszkodzenia *in vivo*.

1.6.3. Inżynieria błony komórkowej

Dołączenie różnych cząsteczek do błony komórkowej lub modyfikacja jej elementów obecnych na powierzchni MSCs stanowi technikę, która cieszy się szczególnym zainteresowaniem w ostatnich kilkunastu latach. Istnieje kilka wariantów tej metody, których podstawę stanowi przeprowadzenie reakcji chemicznej prowadzącej do modyfikacji aktywności receptorów obecnych na powierzchni komórek (Sackstein i in., 2008) lub przyłączenie całych białek do błony komórkowej (Cheng i in., 2012). Możliwe jest również wprowadzenie interesującego nas białka poprzez wymuszenie integracji pęcherzyków zawierających określony receptor z błoną komórkową MSCs (Sarkar i in., 2010) lub koniugacja z przeciwciałem połączonym z odpowiednim receptorem (Lo i in., 2013). Dotychczas, za pomocą tych technik próbowano uzyskać MSCs zdolne do wiązania się z białkami z rodziny selektyn, co mogłoby wspomóc pierwszy etap ich kontaktu z aktywowanymi komórkami śródbłonna. Jedną z pionierskich prac jest opublikowany przez Sackstein i współpracowników artykuł, w którym przeprowadzona została reakcja chemiczna prowadząca do sjałofukozytacji, obecnego na powierzchni MSCs nieaktywnego receptora CD44, dzięki czemu stał się on funkcjonalny (Sackstein i in., 2008). Chemicznie z powierzchnią MSCs połączone zostało również białko K wiążące E-selektynę (Cheng i in., 2012). Domena SLE^x (glikotop sjało-LewisX; ang. Sialyl-Lewis X) receptora PSGL-1 - została natomiast przyłączona do MSCs przy użyciu fragmentu przeciwciała IgG (Lo i in., 2013) oraz wprowadzona do błony komórkowej MSCs dzięki integracji z pęcherzykami zawierającymi w strukturze ich własnej błony komórkowej omawianą domenę (Sarkar i in., 2010). Indukcja obecności receptorów dla selektyn na powierzchni MSCs zapewniła komórkom zdolność do wzmożonego toczenia się i adhezji w obecności sił ścinania w modelach przepływu w naczyniach krwionośnych *in vitro* jak również wspomagała zasiedlanie przez zmodyfikowane komórki szpiku kostnego po ich podaniu systemowym. Ciekawym rozwiązaniem jest również technika o nazwie „protein painting” polegająca na przyłączeniu do powierzchni komórki samych przeciwciał o konkretnym powinowactwie. W dotychczasowych badaniach do MSCs dołączone zostały przeciwciała skierowane przeciwko białkom ICAM-1 (Ko i in., 2010) oraz VCAM-1, co pozwoliło na zwiększenie liczby komórek wiążących się z komórkami śródbłonna naczyń krwionośnych oraz wzmożenie zasiedlania jelita przez podane systemowo komórki w modelu nieswoistego zapalenia jelita u myszy (Ko i in., 2010). Badania, w których określano wpływ inżynierii błony komórkowej MSCs na właściwości tych komórek, nie wykazały szkodliwych skutków zastosowania tej procedury. Dużą zaletą metody jest względnie krótki czas konieczny do uzyskania komórek o pożądanym właściwościach (Cheng i in., 2012). Należy jednak mieć na uwadze, że obecność wprowadzonej modyfikacji otrzymywanej tą techniką ma zazwyczaj charakter tymczasowy (Sarkar i in., 2010).

1.6.4. Zmiana właściwości tkanki docelowej

Kolejną metodą mającą na celu wzmożenie zasiedlania danego regionu przez podane systemowo MSCs jest regulacja tego procesu poprzez zmianę właściwości samego obszaru docelowego. Przykładem może być napromieniowanie tkanek, co powoduje zwiększony napływ i zagnieżdżanie się podanych systemowo komórek w obszarach mięśni, skóry, jelit i szpiku kostnego poddanych działaniu promieni gamma (Chapel i in., 2003; François i in., 2006). Podobnie zastosowanie substancji/leków używanych w trakcie radio- i chemioterapii, które uszkadzają DNA prowadzi do wzmożenia kolonizacji szpiku kostnego przez przeszczepione MSCs prawdopodobnie na drodze oddziaływań receptorów CXCR4 obecnych na komórkach z SDF-1 wydzielanym w dużych ilościach przez uszkodzoną tkankę (Ponomaryov i in., 2000). Możliwe jest także kontrolowanie migracji przeszczepionych komórek dzięki działaniu pola elektrycznego (Zhao i in., 2011) lub magnetycznego

(Landázuri i in., 2013) a także fali ultradźwiękowej (Li i in., 2015b). Użycie pola elektrycznego zostało jak dotąd zastosowane w badaniach *in vitro* w związku z dużym ryzykiem przegrzania obszarów poddawanych jego działaniu (Zhao i in., 2011). Działanie fali ultradźwiękowej może zostać wykorzystane dla rozszczelnienia bariery krew-mózg, co wykazano w badaniach eksperymentalnych, których celem było zwiększenie wydajności dostarczania leków do struktur OUN (Liu i in., 2010b). Wydaje się, że ultradźwięki mogą być również zastosowane w celu ułatwienia przenikania przeszczepianym komórkom do obszarów uszkodzenia. Ciekawym rozwiązaniem jest ukierunkowanie migracji komórek wyznakowanych magnetycznymi nanocząstkami do określonego rejonu dzięki umieszczeniu tego obszaru w obrębie pola magnetycznego. Silne właściwości magnetyczne nanocząstek żelaza wprowadzonych do MSCs mogą zostać wykorzystane do zwiększenia akumulacji znakowanych komórek w miejscu uszkodzenia, dzięki przyłożeniu zewnętrznego źródła pola magnetycznego w obszarze lezji. Metoda ta została między innymi z powodzeniem wykorzystana w celu uzyskania akumulacji podanych do uszkodzonej tętnicy MSCs w obszarze lezji po wykonaniu zabiegu angioplastyki (Riegler i in., 2013).

Reasumując, w dostępnych źródłach literaturowych możemy znaleźć prace pokazujące, że MSCs podlegają mobilizacji do uszkodzonych tkanek w sposób aktywny, jednak mechanizm odpowiedzialny za ten proces nie został jak dotąd poznany. Jednym z problemów związanych z dokładną obserwacją migracji komórek po ich transplantacji jest brak metod charakteryzujących się rozdzielczością wystarczającą do przeprowadzenia dokładnej analizy tego procesu zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Zasiedlanie rejonów uszkodzenia w tkance przez systemowo podane komórki jest dużo mniej wydajne w przypadku MSCs niż u leukocytów, czego przyczyną może być brak ekspresji istotnych dla tego procesu receptorów dla chemokin i białek adhezyjnych. Szczególnie trudnym zadaniem jest zaindukowanie zasiedlania przez przeszczepiane komórki struktur OUN ze względu na istnienie bariery krew mózg. Stąd też rozwój metod zwiększających ukierunkowaną migrację systemowo podanych komórek do mózgu jest istotny w celu podniesienia wydajności terapii z użyciem egzogennych MSCs w chorobach neurodegeneracyjnych.

2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Uszkodzenie struktur ośrodkowego układu nerwowego (OUN) towarzyszące ostrym lub przewlekłym chorobom neurologicznym oraz związane z tym długotrwałe deficyty funkcji ruchowych i poznawczych sprawiają, iż poszukiwanie sposobów regeneracji zmienionej tkanki nerwowej skupia od wielu lat uwagę środowisk medycznych. Odkrycie metod pozyskiwania komórek macierzystych z różnych źródeł stworzyło możliwość ich zastosowania w naprawie uszkodzeń OUN. W początkowym okresie badań eksperymentalnych wybór neuralnych komórek macierzystych (NSCs) wydawał się najbardziej optymalnym podejściem terapeutycznym gdyż zakładano, że przeszczepiane progenitory neuralne zastąpią zniszczone neurony w rejonie uszkodzenia. Dotychczasowe wyniki badań prowadzonych w wielu ośrodkach dowiodły, że obserwowane pozytywne efekty transplantacji NSCs nie wynikają z przekształcania się egzogennych komórek w dojrzałe neurony, ale z ich działania neuroprotekcynnego i stymulacji endogennych procesów naprawczych. Stąd w ostatnich latach zainteresowanie naukowców i klinicystów przesunęło się w kierunku łatwo dostępnych mezenchymalnych komórek macierzystych (MSCs), charakteryzujących się silnymi właściwościami parakrynnymi. W ustaleniu rekomendacji dla zastosowań MSCs w regeneracji uszkodzonych struktur OUN uwzględniono także ich dużą zdolność migracji, sekrecję czynników neurotroficznych, niską immunogenność i właściwości immunomodulacyjne. Dotychczasowe badania eksperymentalne u zwierząt wykazały zadowalającą skuteczność MSCs w leczeniu udaru mózgu, podczas gdy badania kliniczne nie przyniosły jednoznacznych wyników. Jedną z przyczyn tej rozbieżności może być różnica w wielkości mózgu i większe trudności z zasiedleniem struktur OUN przez przeszczepione komórki u ludzi. Dlatego droga dostarczenia komórek do mózgu może mieć kluczowe znaczenie dla translacji wyników badań na zwierzętach do warunków klinicznych. Podanie komórek poprzez bezpośrednie nakłucie mózgu jest szczególnie ryzykowne u pacjentów z udarem mózgu ze względu na udarowe uszkodzenie naczyń krwionośnych oraz terapeutyczne obniżenie krzepialności krwi. Z drugiej strony dożylnie podanie może wymagać bardzo dużej liczby komórek ze względu na ich niespecyficzną dystrybucję w całym organizmie. W tym kontekście szczególnie atrakcyjna wydaje się być ich transplantacja dotętnicza. Pozwala ona na celowane podanie komórek do okolicy mózgu objętej udarem ograniczając liczbę niezbędnych komórek, a wprowadzenie do leczenia udaru mózgu przetętnicznej trombektomii dodatkowo ułatwia wykorzystanie tej drogi podania komórek. Zwiększenie ekspresji białek odpowiedzialnych za adhezję i migrację może mieć pozytywny wpływ na przechodzenie przeszczepianych komórek z łożyska naczyniowego i ich mobilizację do rejonu uszkodzenia. Badania Gorelik i wsp. (2012) wykazały, że wywołanie w progenitorach glejowych (GRPs) nad-ekspresji cząsteczek adhezyjnych VLA-4, białka zaangażowanego fizjologicznie w proces diapedezy leukocytów, skutkowało zwiększonym gromadzeniem się zmodyfikowanych GRPs w naczyniach mózgu po iniekcji dotętnicznej (Gorelik i in., 2012). Obserwacje te stanowiły podstawę do zaprojektowania badań, będących przedmiotem mojej pracy doktorskiej. Istotą tych badań była analiza wstępnych etapów diapedezy, niezbędnych w procesie transmigracji ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego (hBM-MSCs), charakteryzujących się zwiększoną ekspresją cząsteczek VLA-4. Wizualizacja tych komórek wymaga zastosowania znaczników stąd moje badania wstępne miały na celu wybór najbardziej optymalnego barwnika do przyżyciowego znakowania hBM-MSCs, który nie zmieniałby cech biologicznych znakowanych komórek jednocześnie umożliwiając ich identyfikację w długoczasowych eksperymentach prowadzonych w warunkach *in vitro* i *in vivo*.

Przedmiotem prowadzonych przeze mnie badań były ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego (LONZA) z wywołaną nad-ekspresją receptora VLA-4. Komórki te uzyskano poprzez transfekcję mRNA ITGA4 kodującego podjednostkę $\alpha 4$ integryny VLA-4 wg metody opracowanej w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej. Badania funkcjonalne hBM-MSCs *in vitro* wykonano z użyciem komór mikroprzepływowych (*microfluid device*) i szalek migracyjnych typu *transwell*.

Doświadczenia *in vivo* przeprowadzono u dorosłych szczurów stada Wistar w modelu ogniskowego uszkodzenia mózgu z zastosowaniem inhibitora pompy sodowo-potasowej (ouabainy) opracowanego w naszym zespole (Janowski i in., 2008).

Celem moich badań było zweryfikowanie hipotezy, że zwiększenie ekspresji integryny VLA-4 w ludzkich mezenchymalnych komórkach macierzystych szpiku kostnego (hBM-MSCs) pozwoli na wzmocnienie ich właściwości adhezyjnych i transmigracyjnych po transplantacji dotętnicznej u szczurów w modelu uszkodzenia mózgu.

Badania były realizowane w trzech etapach stanowiących szczegółowe cele pracy:

- I etap badań dotyczył wyboru optymalnej techniki przyżyciowego znakowania hBM-MSCs umożliwiającej ich wizualizację w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*
- II etap badań był poświęcony ocenie kinetyki ruchu hBM-MSCs wykazujących nad-ekspresję receptorów VLA-4 uczestniczących w adhezji i transmigracji komórek w warunkach *in vitro*
- III etap badań miał za zadanie ocenę zasiedlania mózgu szczurów przez uzyskane drogą inżynierii mRNA ITGA4 komórki hBM-MSCs po ich transplantacji do tętnicy szyjnej wewnętrznej w modelu uszkodzenia prądkowia

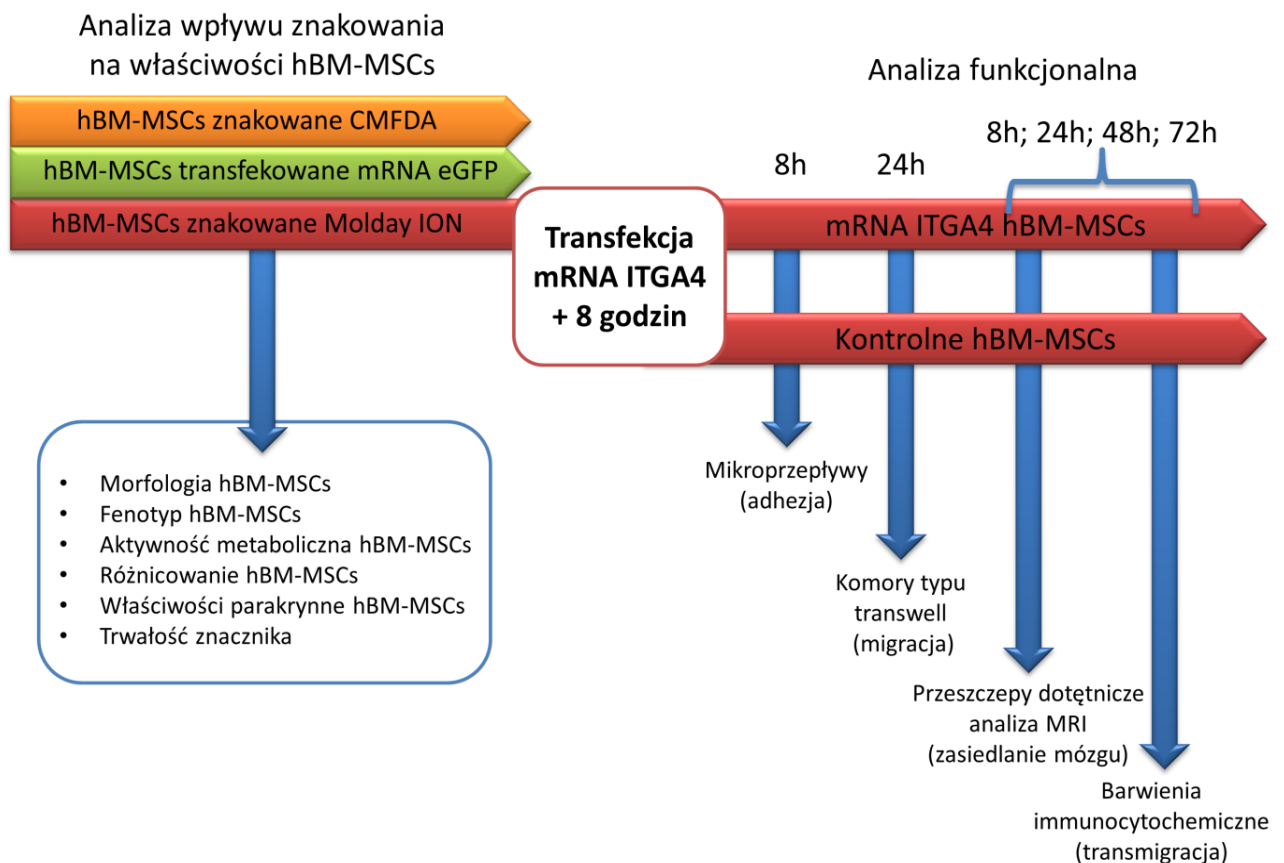
3. MATERIAŁ

3.1. Ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego

Przedmiotem badań były ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego (hBM-MSCs) pobrane od zdrowych, dobranych losowo, dorosłych dawców obydwu płci w wieku 19-38 lat. Zostały one zakupione w firmie Lonza w opakowaniach 75×10^4 komórek na fiolkę na etapie drugiego pasażu. hBM-MSCs charakteryzowały się obecnością markerów CD29, CD44, CD105, CD166 jak również nie wykazywały ekspresji białek CD14, CD34 i CD45.

3.2. Zwierzęta doświadczalne

Do badań *in vivo* wykorzystano dorosłe samce szczurów stada Wistar w wieku około 3 miesięcy, o masie ciała 250-280 g, pochodzące z Charles River Sulzfeld, hodowane w zwierzętarni Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN imienia M. Mossakowskiego. Zwierzęta w trakcie doświadczeń przebywały w klatkach hodowlanych, w pomieszczeniu pooperacyjnym, w cyklu dobowym dzień/noc (12 godzin: 12 godzin), ze stałym dostępem do pokarmu i wody. Wszystkie procedury eksperymentalne odbywały się zgodnie z zaleceniami Unii Europejskiej i zostały zatwierdzone przez IV Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie (Uchwała nr 17/2012 z dnia 05.03.2012 roku).



Ryc. 5. Schemat prowadzonych doświadczeń

4. METODY BADAŃ

4.1. Hodowla komórek hBM-MSCs

Ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego (hBM-MSCs) (Lonza) wysiewano do butelek o powierzchni 75 cm², w gęstości 3x10⁵ komórek/butelkę i hodowano w pożywce MSCBM (Lonza) z dodatkiem 10 % suplementu MCGS, L-glutaminy i gentamycyny, w warunkach standardowych (atmosfera powietrza z zawartością, 5 % CO₂, o wilgotności 95 % i temperaturze 37 °C), pożywka hodowlana była wymieniana dwa razy w tygodniu. W celu utrzymania stałego poziomu proliferacji hBM-MSCs były pasażowane w odstępach 5-7 dniowych po osiągnięciu przez nie 70-80 % stopnia konfluencji. Do doświadczeń używano komórek z pasażów 4-6.

4.2. Znakowanie komórek hBM-MSCs markerem CellTracker™ Green CMFDA

Komórki hBM-MSCs przeznaczone do badań *in vitro* były znakowane zielonym markerem fluorescencyjnym CMFDA (ang. 5-chloromethyl-fluorescein-diacetate) (Molecular Probes) wiążącym się z lipidami błon wewnątrzkomórkowych, co umożliwiało ich późniejszą detekcję w stosowanych układach doświadczalnych. Pierwszym etapem procedury znakowania było przygotowanie roztworu znacznika. W tym celu 1 µl 10 µM roztworu CellTracker™ Green CMFDA (Life Technologies) zawieszony w dimetylosulfotlenku dodawano do 5 ml pożywki Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (Life Technologies). Następnie powyższym roztworem znacznika zalewano komórki hBM-MSCs rosnące w postaci hodowli jednowarstwowej płaskiej na szalkach hodowlanych. Przed znakowaniem, znad komórek usuwana była pożywka hodowlana, a hBM-MSCs były dwukrotnie płukane buforem fosforanowym (PBS, Gibco). Po 40 minutowej inkubacji w 37 °C wyznakowane hBM-MSCs płukano trzykrotnie buforem fosforanowym (PBS, Gibco) i zawieszano w odpowiedniej pożywce stosowanej w danym eksperymencie.

4.3. Znakowanie komórek hBM-MSCs przy użyciu Molday ION

Komórki hBM-MSCs przeznaczone do badań *in vitro* lub *in vivo* znakowano Molday ION (superparamagnetycznymi nanocząstkami tlenku żelaza (SPIO) skoniugowanymi z rodaminą B™). W tym celu do hBM-MSCs hodowanych w pożywce MSCBM (Lonza) dodawano 20 µg/ml znacznika Molday ION (BioPAL), komórki inkubowano ze znacznikiem w temp. 37 °C, 5 % CO₂, przez 18 godzin. Po inkubacji wyznakowane hBM-MSCs trzykrotnie płukano PBS, a następnie umieszczano w pożywce MSCBM gotowe do eksperymentów.

4.4. Transfekcja komórek hBM-MSCs Stemgent® eGFP mRNA

Kolejnym wybranym przez nas znacznikiem przyżyciowym umożliwiającym detekcję hBM-MSCs w układach doświadczalnych był marker zielonej fluorescencji eGFP. Transfekcję komórek mRNA kodującym białko eGFP - Stemgent® eGFP mRNA (Stemgent) przeprowadzono przy użyciu odczynnika Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Life Technologies). W tym celu 2x10⁵; 5x10³ lub 1x10³ hBM-MSCs wysiewano odpowiednio do butelki T25, dołka szalki 24-dołkowej lub dołka szalki 96-dołkowej i hodowano w pożywce MSCBM (Lonza) do osiągnięcia przez komórki 70 % konfluencji. Na pół godziny przed transfekcją usuwano standardową pożywkę hodowlaną, komórki płukano PBS i dodawano pożywkę Opti-MEM® I Reduced Serum Medium w objętości stanowiącej ½ objętości końcowej roztworu zawierającego czynnik transfekcyjny. W osobnych probówkach zawierających pożywkę Opti-MEM® I Reduced Serum Medium zawieszano Lipofektaminę w stosunku 1:27 i czynnik transfekcyjny – mRNA w stosunku 1:22, a następnie inkubowano w temperaturze pokojowej (TP) przez 5 min. Tak przygotowane roztwory mRNA i Lipofektaminy mieszano ze sobą w stosunku 1:1 i inkubowano w TP

przez 20 min w celu utworzenia lipopleksów. hBM-MSCs poddawano działaniu mieszaniny transfekcyjnej w dawce 5 µg/ml mRNA eGFP. Po 4 godzinach inkubacji w temp. 37 °C, 5 % CO₂ komórki hBM-MSCs trzykrotnie płukano PBS i umieszczano w pożywce MSCBM.

4.5. Ocena aktywności metabolicznej komórek hBM-MSCs

Istotą badań było sprawdzenie czy przyżyciowe znakowanie hBM-MSCs wybranymi markerami nie wpływa na poziom aktywności metabolicznej komórek *in vitro*. Do oceny zmian aktywności metabolicznej hBM-MSCs nieznakowanych oraz znakowanych znacznikami: CMFDA, Molday ION lub transfekowanych mRNA eGFP użyto zestawu Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo Laboratories), zgodnie z wytycznymi producenta. Aktywność metaboliczną komórek kontrolnych (nieznakowanych) i komórek należących do grup eksperymentalnych (znakowanych) badano w sekwencji czasowej przez 6 kolejnych dni hodując hBM-MSCs w płytkach 96-dołkowych, w gęstości 1x10³ komórek/dołek w pożywce MSCBM (Lonza) w temp. 37 °C, 5 % CO₂. Dwie godziny przed wykonaniem pomiaru do pożywki, w której hodowano komórki, dodawano odczynnik CCK-8 w stosunku objętości 1:10. Odczyt absorbancji wykonywano przy użyciu spektrofotometru FLUOstar Omega (BMG Labtech) przy długości fali 450 nm.

4.6. Analiza immunocytochemiczna komórek hBM-MSCs

Badania immunocytochemiczne hBM-MSCs miały na celu określić wpływ przyżyciowego znakowania komórek poszczególnymi markerami na ekspresję wybranych antygenów. Analizie poddano hBM-MSCs natywne (nieznakowane) oraz znakowanych markerami: CMFDA, Molday ION lub transfekowane mRNA eGFP. W tym celu badane komórki, pozostające w hodowli *in vitro* trzykrotnie przepłukiwano PBS i utrwalano poprzez 15 minutową inkubację w 4 % roztworze paraformaldehydu (PFA) w PBS. W przypadku oceny antygenów wewnątrzkomórkowych hBM-MSCs poddawano permeabilizacji błony komórkowej podczas 3 minut inkubacji z 0.05 % Triton X100 w PBS. Reakcje immunocytochemiczne przeprowadzono stosując I-rzędowe przeciwciała specyficzne dla określonych antygenów oraz przeciwciała II-rzędowe sprzężone z fluorochromami. Przed inkubacją z pierwszym przeciwciałem przeprowadzono blokowanie wiązań nieswoistych poprzez 90 min inkubację hBM-MSCs w 3% roztworze albuminy wołowej (ang. bovine serum albumin; BSA) (Sigma Aldrich). Reakcje z przeciwciałami I-rzędowymi: mysie IgG1 anty-CD44, -CD90; mysie IgG3 anty-SSEA4, królicze poliklonalne anty-CXCR4 (Tabela 1) przeprowadzono w czasie całonocnej inkubacji komórek w mokrej komorze w temperaturze 4 °C. Dla rozwinięcia reakcji barwnych zastosowano odpowiednie przeciwciała II-rzędowe sprzężone z fluorochromami: kozie anty-mysie IgG1 Alexa Fluor 488 lub Alexa Fluor 546; kozie anty-mysie IgG2a Alexa Fluor 488 lub Alexa Fluor 546; kozie anty-mysie IgG (H+L) Alexa Fluor 488 lub Alexa Fluor 546; kozie anty-królicze IgG Alexa Fluor 488 lub Alexa Fluor 546 (Tabela 2). Procedurę znakowania hBM-MSCs przeprowadzono przez 90 minut inkubacji z przeciwciałami drugorzędowymi w ciemności w temperaturze pokojowej. Dodatkowo jądra badanych komórek barwiono 5 µM roztworem Hoechst 33258 (Sigma) przez 15 minut. Jako kontrolę specyficzności użytych przeciwciał zastosowano powyższą procedurę barwienia z pominięciem znakowania przeciwciałem I-rzędowym. Preparaty zamykano przy użyciu odczynnika Fluorescent Mounting Medium (Dako). Wyniki badań immunocytochemicznych analizowano w mikroskopie fluorescencyjnym Axiovert.A1 Zeiss w programie *Zen blue*. W celu dokumentacji badań wykonano zdjęcia przygotowanych preparatów mikroskopowych.

Tabela 2. Spis przeciwciał pierwszorzędowych użytych w analizie immunocytochemicznej i immunohistochemicznej

| Przeciwciało/ Gospodarz | Izotyp/ Rozcieńczenie | Producent/ Numer Katalogowy |
|--------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| Monoklonalne anty-CD90 / Mysie | IgG1 / 1:250 | Santa Cruz / sc-59398 |
| Monoklonalne anty-SSEA4 / Mysie | IgG3 / 1:250 | Merck Millipore/ MAB4304 |
| Poliklonalne anty-CXCR4 / Królicze | IgG / 1:250 | Merck Millipore / AB1846 |
| Monoklonalne anty-CD44 / Mysie | IgG1 / 1:250 | Santa Cruz / sc-7297 |
| Poliklonalne anty-Laminina/ Królicze | IgG / 1:100 | Novus Biologicals / NB300-144 |
| Monoklonalne anty-Klaudyna-5 / Mysie | IgG1 / 1:200 | Thermo Fisher Scientific / 35-2500 |
| Monoklonalne anty-ED1/ Mysie | IgG1 / 1:100 | Serotec / MCA341R |

Tabela 3. Spis przeciwciał drugorzędowych użytych w analizie immunocytochemicznej i immunohistochemicznej.

| Przeciwciało/ Gospodarz | Fluorochrom | Izotyp/ Rozcieńczenie | Producent / Nr Kat. |
|---------------------------------|-------------|-----------------------|---------------------|
| Alexa Fluor kozie anty-mysie | 488 | IgG1 / 1:500 | Invitrogen / A21121 |
| Alexa Fluor kozie anty-mysie | 546 | IgG1/ 1:500 | Invitrogen / A21123 |
| Alexa Fluor kozie anty-mysie | 488 | IgG (H+L) / 1:500 | Invitrogen / A11001 |
| Alexa Fluor kozie anty-mysie | 546 | IgG (H+L) / 1:500 | Invitrogen / A11003 |
| Alexa Fluor kozie anty-królicze | 488 | IgG (H+L) / 1:500 | Invitrogen / A11008 |
| Alexa Fluor kozie anty-królicze | 546 | IgG (H+L) / 1:500 | Invitrogen / A11035 |
| Alexa Fluor kozie anty-królicze | 633 | IgG (H+L) / 1:500 | Invitrogen / A21070 |

4.7. Analiza ekspresji wybranych genów w komórkach hBM-MSCs

W celu określenia wpływu przyżyciowego znakowania analizowanymi znacznikami (Molday ION, CMFDA oraz mRNA eGFP) na aktywność parakrynną hBM-MSCs, wykonano analizę ekspresji mRNA dla wybranych czynników wzrostu. Pierwszym etapem analizy ekspresji genów w hBM-MSCs natywnych lub znakowanym przyżyciowo poszczególnymi markerami była izolacja całkowitego RNA z komórek kontrolnych (nieznakowanych) bądź znakowanych: CMFDA, Molday ION lub transfekowanych eGFP mRNA, stosując zmodyfikowaną metodę Chomczyńskiego (Chomczynski i Sacchi, 1987) hodowanych *in vitro* przez 2, 5 lub 7 dni. W reakcji odwrotnej transkrypcji przeprowadzonej przy użyciu zestawu High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems), zgodnie z zaleceniami producenta, używano 4 µg RNA uzyskanego z badanych próbek. Analizę ekspresji genów: BDNF (ang. Brain Derived Neurotrophic Factor), GDNF (ang. glial cell line-derived neurotrophic factor), CNTF (ang. Ciliary Neurotrophic Factor), NT3 (ang. Neurotrophin 3), PSAP (ang. Prosaposin), EGF (ang. Epidermal growth factor), IGF (ang. Insulin-like growth factors), SEM (ang. Semaphorin) wykonano przy użyciu metody Real Time PCR. Startery do amplifikacji powyższych genów zaprojektowano przy użyciu programu BLAST lub wykorzystano sekwencje dostępne w literaturze. Zaprojektowane startery wykonano w firmie Sigma-

Genosys. Lista użytych starterów znajduje się w Tabeli 3. Reakcję prowadzono w obecności odczynnika SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) w aparacie ABI Prism 7500 Sequence Detection System. Poziom ekspresji badanych prób normalizowano względem genu referencyjnego dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH). Analizę wyników wykonano stosując metodę $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak i Schmittgen, 2001).

Tabela 4. Spis starterów użytych w reakcji Real Time PRC

| Gen/Białko | Sekwencja starterów |
|---|-------------------------|
| | Forward |
| Czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego (GDNF) | TTTAGGTACTGCAGCGGCTCTT |
| Dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) | CCACATCGCTCAGACACCAT |
| Insulino-podobny czynnik wzrostu (IGF) | TGCTTCCGGAGCTGTGATCTA |
| Naskórkowy czynnik wzrostu (EGF) | GCAGAGGGATACGCCCTAAGT |
| Neurotrofina 3 (NT3) | AACATCACGGCGGAAACGGTAC |
| Neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF) | ATTACAATCAGATGGGCCACATG |
| Prosapozyna (PSAP) | AACAGACCAGGTGTCCTTGG |
| Rzęskowy czynnik neurotroficzny (CNTF) | TGTGCGTGCTTGCATGTG |
| Semaforyna (SEM) | CCCTGGGGAACTTCTACCTC |

4.8. Różnicowanie hBM-MSCs w kierunku adipocytów

Badania wpływu przyżyciowego znakowania hBM-MSCs na ich zdolność do różnicowania się w podstawowe trzy typy komórek wywodzących się z mezodermy stanowiły kolejny etap badań *in vitro*. W celu określenia zdolności hBM-MSCs do różnicowania w kierunku adipocytów komórki natywne (nieznakowane) oraz znakowane CMFDA, Molday ION lub transfekowane eGFP mRNA wysiewano na szalkę 24-dołkową w gęstości 1.5×10^5 komórek/dołek i hodowano w pożywce stymulującej adipogenezę StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit w warunkach standardowych (atmosfera powietrza z zawartością, 5 % CO₂, o wilgotności 95 % i temperaturze 37 °C) przez 15 dni. Pożywkę

hodowlaną wymieniało, co drugi dzień. Po upływie 15 dni hBM-MSCs trzykrotnie płukano PBS i utrwalano przez 30 minut roztworem 4 % PFA, a następnie ponownie trzykrotnie płukano PBS. Ocena komórek przeprowadzono przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Axiovert.A1 Zeiss w programie *Zen blue*.

4.9. Różnicowanie komórek hBM-MSCs w kierunku osteoblastów

Analizę zdolności różnicowania się hBM-MSCs w kierunku osteoblastów przeprowadzono w hodowlach komórek natywnych lub znakowanych CMFDA, Molday ION lub transfekowanych mRNA eGFP. Po 24 godzinach od znakowania komórki odklejano od dna naczynia hodowlanego przy użyciu trypsyny, wirowano (3 min 1000 rpm) i liczone a następnie wysiewano do szalki 24-dołkowej w gęstości 1×10^3 hBM-MSCs/dołek i inkubowano w pożywce MSCBM (Lonza) przez 4 godziny. Po tym czasie wykonywano zmianę pożywki hodowlanej na pożywkę StemPro Osteogenesis Differentiation Kit (Gibco), w której komórki hodowano w temp. 37 °C, 5 % CO₂ przez kolejne trzy tygodnie. Pożywkę hodowlaną wymieniało, co trzeci dzień. Po upływie 21 dni hBM-MSCs przepłukiwano DPBS (Lonza) i utrwalano w 4 % PFA przez 30 minut, a następnie płukano dwukrotnie wodą destylowaną i barwiono 2 % czerwinią alizarynową (Sigma Aldrich) przez 3 minuty. Nadmiar barwnika usuwano poprzez trzykrotne płukanie wodą destylowaną. Ocena fenotypową komórek przeprowadzono przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Axiovert.A1 Zeiss w programie *Zen blue*.

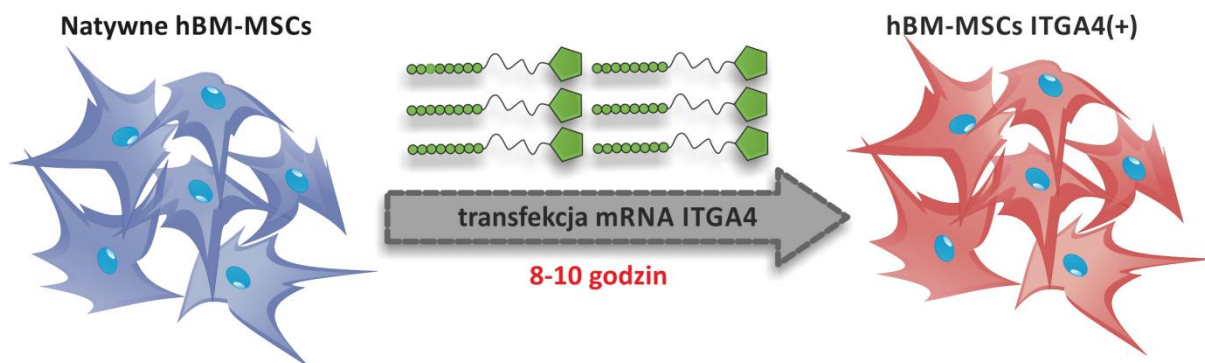
4.10. Różnicowanie komórek hBM-MSCs w kierunku chondrocytów

W celu określenia zdolności hBM-MSCs do różnicowania w kierunku chondrocytów po ich przyżyciowym znakowaniu hodowane *in vitro* komórki natywne bądź znakowane CMFDA, Molday ION lub transfekowane eGFP mRNA pozostające w hodowli przez 24 godziny po znakowaniu, odklejano od dna naczynia hodowlanego przy użyciu trypsyny i wirowano (3 min 1000 rpm). Nadsącz z nad komórek usuwano poprzez dekantację, a zebrane w postaci osadu hBM-MSCs wysiewano do szalki 24-dołkowej w postaci 5 µl kropli zawierających 1×10^5 komórek/kroplę i umieszczano w temp. 37 °C, 5 % CO₂ przy bardzo wysokiej wilgotności powietrza w granicach 80-90 %. Po 4 godzinach inkubacji do każdego dołka szalki dodawano pożywkę StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco) i hodowano hBM-MSCs przez 2 tygodnie w temp. 37 °C, 5 % CO₂. Pożywkę hodowlaną wymieniało, co trzeci dzień. Po 14 dniach hodowli w celu weryfikacji zajścia procesu różnicowania hBM-MSCs w kierunku chondrocytów komórki utrwalano poprzez 30 minutową inkubację w 4 % PFA, płukano DPBS i barwiono przez 30 minut 1 % roztworem błękitu alcjańskiego (Sigma Aldrich). Barwnik odpłukiwano dwukrotnie stosując 0.1 N HCl, a wybarwione komórki umieszczano w wodzie destylowanej. Ocena różnicowania komórek przeprowadzono przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego Axiovert.A1 Zeiss w programie *Zen blue*.

4.11. Transfekcja komórek hBM-MSCs mRNA ITGA4

W celu uzyskania hBM-MSCs z nad-ekspresją podjednostki $\alpha 4$ integryny VLA-4 przeprowadzono transfekcję komórek mRNA ITGA4. Procedurę wykonywano przy użyciu odczynnika Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Life Technologies). hBM-MSCs w liczbie 75×10^3 wysiewano do butelek T-75 i pozostawiono do osiągnięcia 70 % konfluencji. Na pół godziny przed transfekcją usuwano standardową pożywkę hodowlaną, komórki płukano PBS, a następnie umieszczano w pożywce Opti-MEM® I Reduced Serum Medium w objętości stanowiącej ½ objętości końcowej roztworu zawierającego czynnik transfekcyjny. W osobnych probówkach zawierających pożywkę Opti-MEM® I Reduced Serum Medium zawieszano Lipofektaminę w stosunku 1:27 i czynnik transfekcyjny – mRNA w stosunku 1:22, a następnie inkubowano w temperaturze pokojowej (TP) przez 5 min. Tak przygotowane roztwory mRNA i Lipofektaminy mieszano ze sobą w stosunku 1:1 i inkubowano w TP przez 20 minut w celu

utworzenia lipopleksów. hBM-MSCs poddawano działaniu mieszaniny transfekcyjnej w dawce 9.45 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Po 4 godzinach inkubacji w temp. 37 $^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 komórki hBM-MSCs trzykrotnie płukano PBS i umieszczano w pożywce MSCBM. Do dalszych eksperymentów używano komórek po 8-10 godzinach od rozpoczęcia procesu transfekcji.



Ryc. 6. Schemat transfekcji hBM-MSCs. W celu uzyskania komórek z nad-ekspresją białka α_4 , hBM-MSCs były poddawane transfekcji mRNA ITGA4 na 8 do 10 godzin przed użyciem ich w dalszych doświadczeniach.

4.12. Pomiar wielkości komórek

W celu określenia wpływu transfekcji mRNA ITGA4 na wielkość hBM-MSCs wykonano pomiar średnicy modyfikowanych i kontrolnych komórek. Pozostające w hodowli natywne komórki hBM-MSCs lub hBM-MSCs 8-10 godzin po transfekcji mRNA ITGA4 odklecano od naczynia hodowlanego poprzez trypsynizację, wirowano przy 1200 obr/min i zawieszono w pożywce hodowlanej. Zawiesinę komórek (50 μl) przenoszono na podstawowe szkiełko mikroskopowe i zamykano nakrywając kroplę zawiesiny szkiełkiem nakrywkowym. Zdjęcia komórek wykonywano w kontraście fazowym przy użyciu mikroskopu Axiovert 25 (Zeiss) wyposażonego w aparat fotograficzny (Canon). Pomiar wielkości każdej komórki przeprowadzono w programie Image-J poprzez ręczne zaznaczenie obwodu komórki narzędziem wielokąta i określenie pola powierzchni zajmowanego przez komórkę, podawanego przez program w pikselach kwadratowych. Badanie przeprowadzono w trzech niezależnych próbach określając wielkość natywnych lub transfekowanych mRNA ITGA4 komórek hBM-MSCs.

4.13. Analiza populacji hBM-MSCs w cytometrze przepływowym

W celu określenia fenotypu hBM-MSCs wyznakowanych Molday ION, CMFDA lub transfekowanych mRNA eGFP przeprowadzono analizę w cytometrze przepływowym. W komórkach w drugim oraz siódmym dniu hodowli *in vitro* (DIV) od znakowania sprawdzano obecność markerów takich jak: CD90, CD44, SSEA4 i CXCR4 (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, Stany Zjednoczone). hBM-MSCs odklecono od naczynia hodowlanego przez trypsynizację, zawieszano w PBS i odwirowywano dwukrotnie przy 1200 obrotów/min. Komórki przeznaczone do znakowania antygenów wewnątrzkomórkowych (CXCR4) umieszczano w buforze do utrwalania (BD Cytotfix) na 20 min w temperaturze 4 $^{\circ}\text{C}$, odpłukiwano dwukrotnie wirując przy 1200 obrotów/min w PBS a następnie przenoszono do buforu do permabilizacji (BD Cytoperm™) na okres 15 minut. Następnie komórki (5×10^5) inkubowano w 100 μl buforu PBS zawierającego 1 % FBS oraz przeciwciała: 2 μl anty-CD90-APC, 5 μl anty-CD44-PeCy7, 5 μl anty-SSEA4-V450 lub 2 μl anty-CXCR4-BV421 przez 30 minut w ciemności. Komórki dwukrotnie odpłukiwano wirując przy 1200 obrotów/min w PBS, a następnie osad zawieszano w 300 μl tego buforu. Bezpośrednio przed pomiarem do zawiesiny hBM-MSCs dodawano 5 μl odczynnika 7AAD i komórki inkubowano przez 10 min w ciemności. Po wykonaniu procedury kompensacji fluorescencją komórek analizowano za pomocą cytometrii przepływowej w urządzeniu

BD FACS Canto II. Dane analizowano przy użyciu oprogramowania FACSDiva (BD Biosciences). Określano względną wielkość (parametr FSC; ang. Forward Scatter, Rozproszenie czołowe wiązki lasera) i ziarnistość (parametr SSC; ang. Side Scatter; Rozproszenie boczne wiązki lasera) komórek, żywotność hBM-MSCs mierzono w teście 7AAD (7-Aminoactinomycin D), a ponadto analizowano odsetek komórek natywnych oraz znakowanych Molday ION, CMFDA oraz transfekowanych mRNA eGFP wykazujących ekspresję markerów CD90, CD44, SSEA4 oraz CXCR4. Intensywność sygnału fluorescencyjnego zmierzono i wyrażono, jako wartość średnią dla 1×10^4 analizowanych komórek. Wszystkie doświadczenia przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

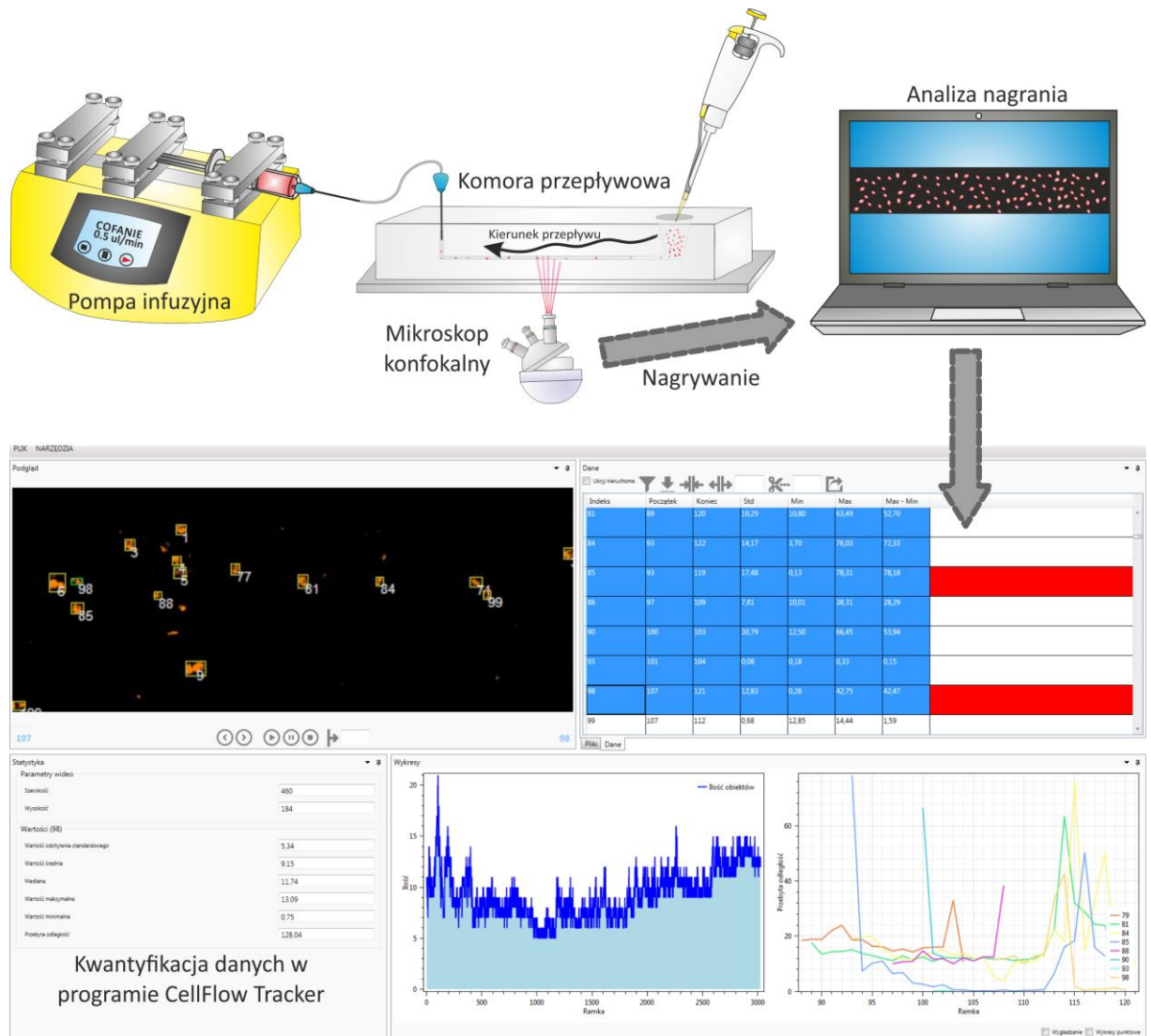
W celu określenia profilu ekspresji integryny $\alpha 4$ u hBM-MSCs poddanych transfekcji mRNA ITGA4 komórki analizowano w cytometrze przepływowym. Komórki hBM-MSCs natywne oraz transfekowane mRNA ITGA4 po 4, 8, 12 i 24 godzinach od transfekcji odklecano od dna butelek hodowlanych poprzez trypsynizację, zawieszono w PBS, wirowano dwukrotnie z szybkością 1200 obrotów/minutę, utrwalano w 2 % PFA przez 10 minut inkubacji z wytrząsaniem (800 obrotów/minutę). W kolejnym etapie hBM-MSCs płukano w PBS poprzez dwa cykle wirowania 1200 obrotów/min i tak przygotowane przechowywano w 4 °C. Bezpośrednio przed analizą 3×10^5 hBM-MSCs zawieszano w 50 μ l 1 % roztworu BSA w PBS zawierającego 0.25 μ l mysiego przeciwciała sprzężonego z fluorochromem BV421, skierowanego przeciwko ludzkiemu białku $\alpha 4$ (CD49d) (Becton Dickinson) i 0.25 μ l mysiego przeciwciała sprzężonego z fluorochromem APC, skierowanego przeciwko ludzkiemu białku CD90 (Becton Dickinson) i inkubowano w ciemności poprzez 40 minut. W celu usunięcia nadmiaru niezwiązanych przeciwciał stosowano dwa cykle wirowania 1200 obrotów/min. Do uzyskanego osadu komórek dodawano 300 μ l PBS. Próbkę analizowano w cytometrze przepływowym BD FACS Canto II stosując oprogramowanie FACSDiva (BD Biosciences) ze skompensowanymi parametrami. Analizę otrzymanych danych przeprowadzono w programie FACSDiva. Poza oceną procentowej wartości komórek posiadających na swojej powierzchni ludzki antygen $\alpha 4$ (CD49d) mierzono siłę sygnału fluorescencyjnego generowanego przez każdą komórkę, która na wykresach została wyrażona, jako średnia mediana z pomiaru wykonanego dla 10 000 komórek w trzech powtórzeniach.

4.14. Ocena ruchu komórek hBM-MSCs *in vitro* podczas ich przepływu przez kanał komory mikroprzepływowej (*microfluid assay*)

4.14.1. Charakterystyka komory mikroprzepływowej i schemat doświadczenia

W celu określenia wpływu modyfikacji hBM-MSCs mRNA ITGA4 na funkcjonalność komórek wykorzystano metodę mikroprzepływów. Do oceny zdolności przylegania natywnych i wykazujących nad-ekspresję cząsteczki VLA-4 komórek hBM-MSCs w warunkach jak najbardziej zbliżonych do fizjologicznych zastosowano komory z układem bardzo precyzyjnych kanałów wykonanych metodą mikro fabrykacji z użyciem litografii, udostępnione przez JHU w Baltimore. Wyjście kanału komory mikroprzepływowej połączono za pomocą silikonowego cewnika (Dow Corning Silastic) z pompą strzykawkową GenieTouch™ (Kent Scientific) (ryc.7). Poprzez to połączenie do kanału komory mikroprzepływowej wprowadzano roztwór 10 μ g/ml ludzkiego rekombinowanego białka VCAM1 (Life Technologies) i pozostawiano przez 90 minut w celu pokrycia powierzchni kanału. Nadmiar białka wyplukiwano z komory stosując ciągły przepływ strumienia wody przez 15 minut. Następnie do kanału komory wprowadzano 1 % roztwór BSA w PBS (Sigma Aldrich) w celu zablokowania niespecyficznych miejsc wiązania. Po 60 minutach inkubacji komorę przepłukiwano strumieniem PBS przez 15 minut. Do tak przygotowanej komory przepływowej, do wejścia kanału wprowadzano przy pomocy pipety

automatycznej zawieszę natywnych lub transfekowanych mRNA ITGA4 hBM-MSCs, uprzednio znakowanych Molday ION Rhodamine B™. Przepływ komórek przez kanał komory wymuszano pracą pompy strzykawkowej zaciągającej ciecz przez 10 min, pracującej z prędkością, przy której wewnątrz komory dochodziło do powstania fizjologicznych wartości sił ścinania wynoszących 1 dyna/cm². Eksperymenty rejestrowano w postaci filmów z wysoką częstotliwością 250 Hz za pomocą systemu Colibri z diodą LED, jako źródłem światła w zakresie widma 540-580 nm połączonego z mikroskopem SD Cell Observer (Carl Zeiss Inc). Przyspieszenie przechwytywania obrazu uzyskano dzięki wstępnej obróbce obrazu używając ustawień *binning 3x3*.



Ryc. 7. Schemat układu doświadczenia stosowanego do oceny ruchu komórek hBM-MSCs *in vitro* podczas ich przepływu przez kanał komory mikroprzepływowej (microfluid assay).

4.14.2. Oprogramowanie do wysoko przepustowej analizy oddziaływań hBM-MSCs w komorach przepływowych

Przy użyciu języka programowania C #, *framework* .NET i wzorca MVVM (Model-View-Viewmodel), we współpracy z programistami opracowano dedykowane moim badaniom oprogramowanie (CellFlow

Tracker) do automatycznej analizy interakcji hBM-MSCs z białkiem VCAM1 w kanałach komórek mikroprzepływowych na podstawie nagranych filmów. Aplikacja wymaga systemu Windows i systemu .NET Framework 4. Pozwala to użytkownikowi na przetwarzanie klatek wideo oraz wykrywanie i analizowanie obiektów (blobów) przepływających przez widoczne obszary. Do analizy obiektów użyto algorytmu znakowania elementów połączonych, które nazywają się blobami i odpowiadają pojedynczym komórkom. Ruch blobów pomiędzy klatkami wykrywany jest w oparciu o dopasowanie stosując określone kryteria: 1) odległość pomiędzy blobami oraz 2) momenty geometryczne i granice blobów. Dobrane zostały najlepiej pasujące ramki dodawane do sekwencji blob, która reprezentuje ruch obiektu. Schemat pracy CellFlow Tracker składał się z: 1) załadowania pliku wideo; 2) odczytania bieżącej ramki wideo (obrazu), jako mapy bitowej przy użyciu ramki Video for Windows; oraz 3) analizy ramki i wykryciu blobów. W aplikacji przeprowadzona została analiza prędkości blobów i korekcja sekwencji śledzenia zidentyfikowanych blobów przez dodawanie lub usuwanie blobów, a także kadrowanie lub łączenie sekwencji. Ponadto sekwencje filtrowano przez parametry, takie jak czas trwania (w ramach) i prędkość (odchylenie standardowe, średnie, mediany, wartości minimalne i maksymalne). Uzyskane w programie dane były eksportowane do plików csv.

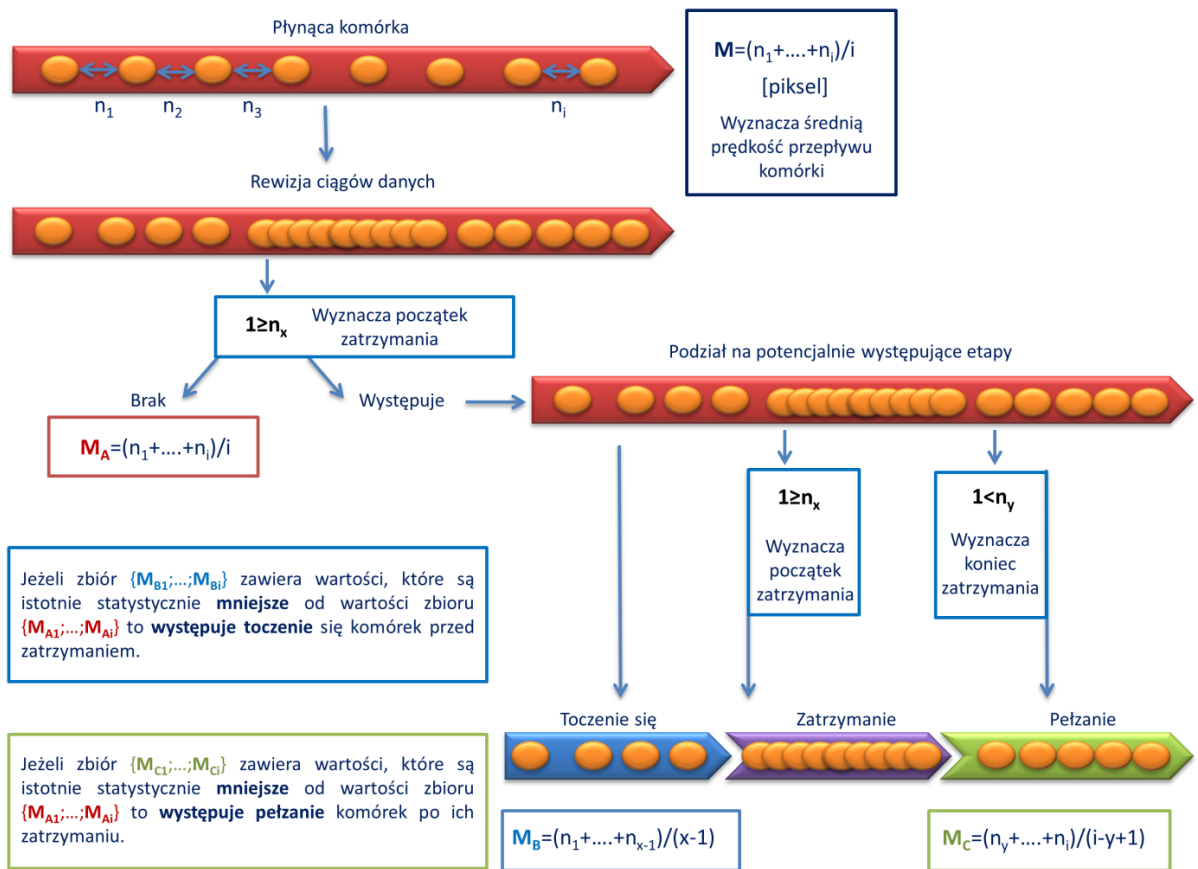
4.14.3. Walidacja działania programu CellFlow Tracker

W celu przeprowadzenia walidacji nowego oprogramowania poprawność automatycznego pomiaru ruchu komórek dokonywanego przez program CellFlow Tracker zweryfikowano względem manualnego pomiaru odległości, jaką pojedyncza komórka pokonywała między kolejnymi klatkami filmu w programie Image-J. Do ręcznego oznaczania śledzonych komórek na każdej klatce nagrania użyto znacznika wielopunktowego, natomiast za pomocą prostej linii łączącej kolejne oznaczone punkty dokonano pomiaru odległości wyrażonej w pikselach. Porównanie danych uzyskanych z pomiarów wykonanych ręcznie i przy użyciu programu CellFlow Tracker przeprowadzono dla losowo wybranych komórek na pięciu różnych nagraniach ($n=100$), dla których analizę przeprowadzono w pięciu niezależnych próbach.

4.14.4. Ocena parametrów ruchu komórek

W celu określenia kinetyki ruchu hBM-MSCs dokonano obliczeń ilościowych, jakościowych i porównania wzoru ruchu natywnych i transfekowanych mRNA ITGA4 komórek przepływających przez komorę mikroprzepływową w oparciu o dane uzyskane po analizie nagrań w programie Cell Flow Tracker. Analizie poddano po trzy nagrania dla każdej grupy komórek. Algorytm postępowania przy analizie został przedstawiony na schemacie (ryc.8). Podstawowym z mierzonych parametrów była wartość n , podawana przez program CellFlow Tracker, określająca odległość podaną w pikselach, o jaką dana komórka przemieściła się pomiędzy dwiema następującymi bezpośrednio po sobie klatkami filmu. Na podstawie tej wartości możliwe było wyznaczenie średniej prędkości przepływu danej komórki nazwanej M . Analiza kolejno następujących po sobie wartości n opisujących ruch danej komórki pozwoliła na segregację wszystkich przepływających komórek do dwóch grup na podstawie obecności lub braku wartości n_x mniejszej bądź równej 1. Brak wartości n_x przyporządkowywał daną komórkę do grupy komórek niezatrzymujących się podczas przepływu, natomiast komórki, u których zidentyfikowana została wartość n_x zostały przyporządkowane do grupy komórek podlegających zatrzymaniu. Dla komórek niepodlegających zatrzymaniu określana była wartość M_A opisująca średnią prędkość przepływu tych komórek. Wewnątrz grupy komórek podlegających zatrzymaniu określana była natomiast obecność wartości n_y wyznaczająca pierwszą następującą po wartości n_x wartość n większą niż 1. Wyznaczała ona moment ponownego rozpoczęcia ruchu danej komórki po zakończeniu

okresu jej zatrzymania. Wartości n_x i n_y pozwoliły na wyznaczenie punktów rozdzielających ciągi danych opisujące ruch komórki podlegającej zatrzymaniu na etapy, które potencjalnie mogły występować podczas przepływu komórki i były analogiczne do etapów występujących podczas diapedezy leukocytów takie jak: toczenie się, zatrzymanie i pełzanie.



Ryc. 8. Schemat algorytmu wykorzystanego przy analizie danych opisujących wzór ruchu hBM-MSCs podczas przepływu w przez kanał komory przepływowej.

W celu jakościowego określenia występowania tych etapów podczas przepływu komórek hBM-MSCs wyznaczone zostały średnie arytmetyczne dla wartości n poprzedzających wartość n_x określane, jako M_B i średnie arytmetyczne dla wartości n rozpoczynających się od wartości n_y , określane, jako M_C . W celu weryfikacji występowania etapów toczenia się i pełzania komórek zbiory średnich prędkości M_B i M_C zostały porównane do zbioru średnich prędkości M_A . Ponieważ zarówno toczenie się jak i pełzanie komórek charakteryzuje się obniżeniem prędkości przepływu względem średniej prędkości ruchu komórek przebiegającego bez interakcji z otoczeniem założono, że wykazanie istotnej statystycznie różnicy w średniej prędkości ruchu komórek przed ich zatrzymaniem (M_B) względem średniej prędkości ruchu komórek przepływających bez zatrzymania (M_A) będzie stanowiło podstawę do jakościowego stwierdzenia braku bądź występowania etapu toczenia się (porównanie zbioru wartości M_B ze zbiorem wartości M_A) i pełzania komórek (porównanie zbioru wartości M_C ze zbiorem wartości M_A). Przeszukiwanie ciągów danych w celu wytypowania punktu pozwalającego na wyznaczenie wartości mniejszej bądź równej jeden (n_x) i obliczenie średnich prędkości z czasu w okresie poprzedzającym zatrzymanie (M_B) odbywało się w programie Microsoft Excel 2010 przy użyciu autorskiego polecenia makro:

Cells(1, 1).Value = "Average"

```

Cells(1, 3).Select
lastrow = Cells(1, 3).End(xlDown).Row
For i = 2 To lastrow
j = 3
wartosc = 0
lastcol = Cells(i, 3).End(xlToRight).Column
Do Until Cells(i, j).Value < 1
j = j + 1
Loop
k = j
Do Until j = lastcol + 1
wartosc = wartosc + Cells(i, j).Value
j = j + 1
Loop
If j - 3 <> 0 Then Cells(i, 1).Value = wartosc / (j - k) Else: Cells(i, 1).Value = "n"
Next i
End Sub

```

Przeszukiwanie ciągów danych w celu wytypowania wartości pozwalającej na znalezienie punktu danych wyznaczającego koniec okresu zatrzymania komórek (n_y) i obliczenie średnich prędkości przepływu w okresie czasu po zatrzymaniu komórek (M_c) odbywało się w programie Microsoft Excel 2010 przy użyciu autorskiego polecenia makro:

```

Cells(1, 1).Value = "Average"
Cells(1, 3).Select
lastrow = Cells(1, 3).End(xlDown).Row
For i = 2 To lastrow
j = 3
wartosc = 0
h = 0
lastcol = Cells(i, 3).End(xlToRight).Column
Do Until Cells(i, j).Value < 1
j = j + 1
Loop
Do Until j = lastcol + 1
If Cells(i, j).Value > 1 Then
wartosc = wartosc + Cells(i, j).Value
h = h + 1
End If
j = j + 1
Loop
If j - 3 <> 0 Then
If h = 0 Then
Cells(i, 1).Value = "n"
Else:
Cells(i, 1).Value = wartosc / h
End If
Else: Cells(i, 1).Value = "n"
End If
Next i
End Sub

```

Na podstawie przedstawionego algorytmu wyróżniono cztery typy interakcji pomiędzy przepływającymi przez komorę przepływową komórek hBM-MSCs a powierzchnią kanału: 1) brak interakcji (charakteryzujący się stosunkowo wysoką prędkością płynącej komórki bez spadków jej prędkości poniżej 1 piksela na klatkę; 2) zatrzymanie komórki rozumiane, jako spadek prędkości ruchu komórki równy lub mniejszy niż 1 piksel/klatkę; 3) toczenie się definiowane wyłącznie wśród komórek, które zostały uznane za komórki podlegające zatrzymaniu, jako stopniowe lub nagłe spowolnienie prędkości przepływającej komórki poprzedzające jej zatrzymanie; 4) pełzanie badane tylko w

przypadku komórek, które zostały uznane za komórki podlegające zatrzymaniu, jako zdarzenie następujące po zatrzymaniu przejawiające się wzrostem szybkości ruchu komórki powyżej 1 piksela na jedną klatkę. Wykonano porównanie wzoru ruchu komórek BM-MSCs natywnych i transfekowanych mRNA ITGA4 uwzględniając: 1) procent komórek podlegających zatrzymaniu; 2) długość czasu zatrzymania; 3) średnią prędkość płynących komórek. Ponadto sprawdzono czy w przypadku komórek podlegających zatrzymaniu we wzorze ich ruchu można wyróżnić etapy toczenia się i pełzania. Ze względu na fakt, że pojedyncza klatka każdego filmu była zbierana co 4 ms, wszystkie komórki podlegające zatrzymaniu zostały przyporządkowane do grup charakteryzujących się okresem czasu zatrzymania w przedziale: 1) 4-40 ms; 2) 40-400 ms; 3) 400-40000 ms; 4) > 4000 ms. Następnie określono procent komórek w każdej z tych grup, zakładając, że populacja wszystkich zatrzymanych komórek wynosi 100 %.

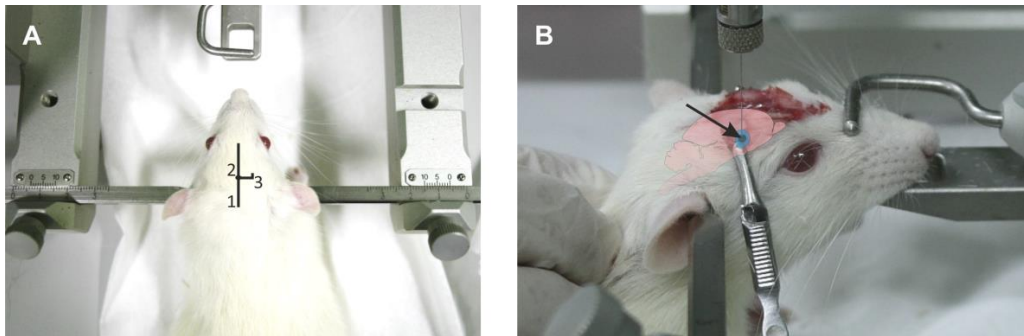
4.15. Ocena migracji komórek w komorach migracyjnych typu *transwell*

W celu dokonania oceny zdolności natywnych i transfekowanych mRNA ITGA4 komórek hBM-MSCs do migracji wykorzystano komory migracyjne. Komory migracyjne typu transwell (Corning) zawierające błony poliwęglanowe z porami o średnicy 8 μm pokrywano kolagenem typu I (Gibco) w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ i inkubowano przez 60 minut w temperaturze pokojowej, po czym trzykrotnie płukano PBS. Błony części komór dodatkowo pokrywano białkiem VCAM1 (10 $\mu\text{g/ml}$) nakładając roztwór białka na powierzchnię błon i pozostawiając w 4 °C przez noc. Komory po trzykrotnym przepłukaniu PBS stosowano w doświadczeniach. W tym celu w dolnej części komory umieszczano pożywkę Opti-MEM® I Reduced Serum Medium (Life Technologies) z dodatkiem 0.1 % BSA lub 0.5 mg/ml homogenatu mózgu szczura, poddanego 48 godzin wcześniej uszkodzeniu prądkowia ouabainą. Do górnej części komory podawano zawieszone w 100 μl pożywki Opti-MEM® I Reduced Serum Medium, znakowane Molday ION natywne lub transfekowane mRNA ITGA4 komórki hBM-MSCs w liczbie 1×10^4 na błonę. Po 24 godzinach inkubacji (37 °C, 5 % CO_2 , wilgotność 95 %) usuwano nieprzyklejone komórki stosując trzykrotne przemywanie błon komór PBS. Kolejnym etapem było utrwalanie pozostałych na błonie hBM-MSCs poprzez 15 minutową inkubację w 4 % roztworze PFA i barwienie jąder komórek przez 5 minut 5 μM roztworem Hoechst 33258. Komórki znajdujące się na górnej powierzchni membrany usuwano mechanicznie przy użyciu bawełnianych wacików. Zdjęcia całych błon poliwęglanowych wykonywano w mikroskopie Axio Observer Z.1 przy użyciu polecenia „*tile scans*” i analizowano w systemie ZEN 2012 blue. Wizualizacja jąder komórkowych posłużyła nam do określenia całkowitej liczby hBM-MSCs, które znajdowały się na dolnej powierzchni błony.

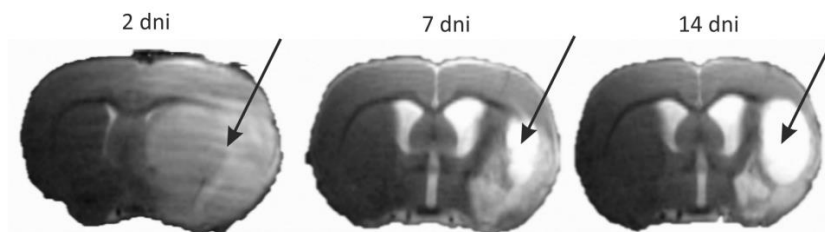
4.16. Model uszkodzenia mózgu ouabainą

Do badań zastosowaliśmy opracowany w naszym zespole model cytotoksycznego uszkodzenia mózgu poprzez podanie inhibitora pompy Na/K – ouabainy (OUA), do prądkowia dorosłych szczurów (Janowski i in., 2008). Przed zabiegiem mikrochirurgicznym dorosłe szczury samce stada Wistar poddawano znieczuleniu ogólnemu poprzez dootrzewnowe wstrzyknięcie Bioketanu (53.6 mg/kg, Vetoquinol) i Domitoru (0.4 mg/kg, Orion Pharma). Po umieszczeniu zwierzęcia w aparacie stereotaktycznym (Stoelting) wykonywano nacięcie skóry głowy wzdłuż szwu strzałkowego i nawiercano otwór trepanacyjny o średnicy 1.5 mm na sklepieniu czaszki, nad prawą półkulą. Następnie przy użyciu 5 μl strzykawki Hamiltona wyposażonej w igłę o długości 15 mm i średnicy 33 mm, połączonej z pompą do mikroinfuzji i systemem nawigacji (Stoelting) podawano do prądkowia 1 μl 50 nmol roztworu ośmio-wodzianu ouabainy (Sigma Aldrich) z prędkością 1 $\mu\text{l/min}$ (koordynaty: A 0.5, L 3.8, D 4.7 mm, punktem odniesienia w płaszczyźnie horyzontalnej była bregma). Po usunięciu igły

brzezi rany na skórze zespalano nicią chirurgiczną. Po operacji zwierzętom podawano podskórnie antybiotyki (Baytril, 0.4 g/kg masy ciała) i środek przeciwbólowy (Rycarfa, 5 mg/kg masy ciała).



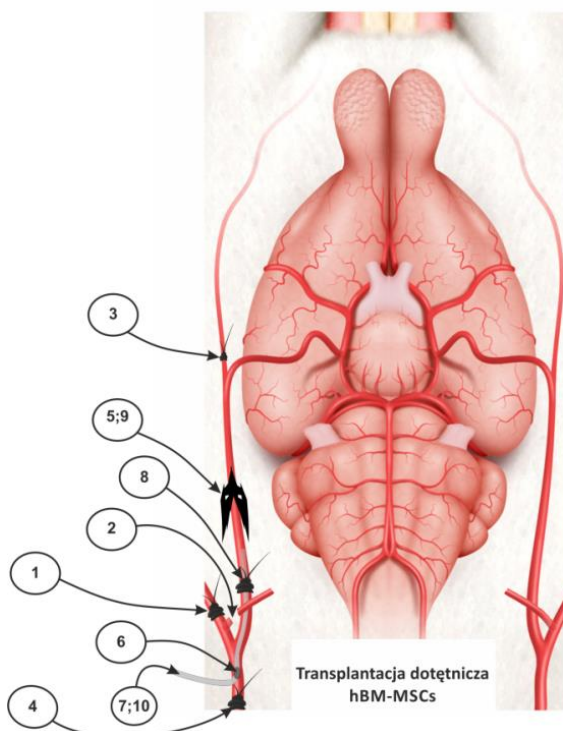
Ryc. 9. Schemat procedury stereotaktycznego podania ouabainy do prążkowiec prawej półkuli mózgu (A) z oznaczeniem linii nacięcia skóry (1), bregmy (2), współrzędnych punktu podania ouabainy (3) oraz obszaru uszkodzenia struktur prążkowiec na głębokości 4.7 mm (B).



Ryc. 10. Schemat rozwoju uszkodzenia mózgu po podaniu ouabainy do prążkowiec prawej półkuli. Zdjęcia pochodzą z obrazowania przy użyciu rezonansu magnetycznego w ciągu kolejnych 14 dni od iniekcji ouabainy. Strzałki wskazują obszar uszkodzenia.

4.17. Dotętnicza transplantacja komórek hBM-MSCs

W celu oceny wpływu modyfikacji komórek przy użyciu mRNA ITGA4 na zasiedlanie uszkodzonego mózgu hBM-MSCs były przeszczepiane dotętniczo u szczurów z wcześniej wykonanym uszkodzeniem ogniskowym mózgu. Materiał transplantacyjny stanowiły dwie populacje komórek hBM-MSCs (natywne i transfekowane mRNA ITGA4) znakowane Molday ION. Biorcami przeszczepu były dorosłe szczury samce stada Wistar, u których 48 godzin wcześniej wykonano uszkodzenie prążkowiec ouabainą. hBM-MSCs podawano zwierzętom w narkozie wziewnej (Aerrane Isoflurane USP) do prawej tętnicy szyjnej wewnętrznej, którą kaniulowano. W celu odstąpienia naczyń i zaopatrzenia mikrochirurgicznego pozostałych naczyń krwionośnych dokonano nacięcia skóry szyi, a następnie izolowano i podwiązywano prawą tętnicę szyjną wspólną, prawą tętnicę szyjną zewnętrzną i tętnicę skrzydłowo-podniebienną. Dodatkowo koagulowano tętnicę potyliczną i zakładano zacisk na prawą tętnicę szyjną wewnętrzną, po czym nacinano prawą tętnicę szyjną wspólną, do której wprowadzano cewnik tak, aby końcówka cewnika dochodziła do prawej tętnicy szyjnej wewnętrznej, z której usuwany był zacisk. Komórki hBM-MSCs natywne lub transfekowane mRNA ITGA4, znakowane Molday ION w liczbie 5×10^5 zawieszono w 1 ml PBS podawano bezpośrednio do prawej tętnicy szyjnej wewnętrznej z prędkością 200 μ l/min. Po wykonaniu infuzji komórek podwiązywano tętnicę szyjną wspólną a brzezi rany na skórze były zespalane przy użyciu szwów chirurgicznych. Po zabiegu zwierzętom podawano podskórnie antybiotyki (Baytril, 0.4 g/kg masy ciała) i środek przeciwbólowy (Rycarfa, 5 mg/kg masy ciała).

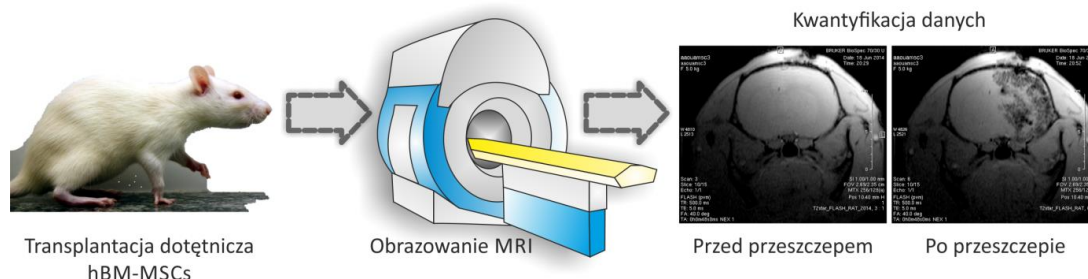


Ryc. 11. Schemat dotętnicznej transplantacji komórek z opisem kolejnych etapów zabiegu obejmujących kolejno: 1. Podwiązanie tętnicy szyjnej zewnętrznej prawej; 2. Koagulację tętnicy potylicznej; 3. Podwiązanie tętnicy skrzydłowo-podniebiennej; 4. Podwiązanie tętnicy szyjnej wspólnej; 5. Założenie klipsa naczyniowego na tętnicę szyjną wspólną prawą; 6. Nacięcie tętnicy szyjnej wspólnej prawej; 7. Wprowadzenie cewnika naczyniowego przez prawą tętnicę szyjną wspólną do tętnicy szyjnej wewnętrznej prawej; 8. Założenie szwu stabilizującego cewnik na tętnicę szyjną wewnętrzną prawą lub tętnicę szyjną wspólną prawą; 9. Zdjęcie klipsa naczyniowego z tętnicy szyjnej wewnętrznej prawej; 10. Podanie hBM-MSCs przez wprowadzony cewnik naczyniowy (schemat zmodyfikowany według Crumrine i in., 2011).

4.18. Obrazowanie mózgu szczura w MRI i analiza uzyskanych obrazów

W celu potwierdzenia obecności i określenia lokalizacji przeszczepionych dotętniczo modyfikowanych mRNA ITGA4 i kontrolnych hBM-MSCs u szczurów z ogniskowym uszkodzeniem mózgu, zwierzęta poddawano obrazowaniu w rezonansie magnetycznym. Podawanie komórek hBM-MSCs obrazowano za pomocą skanera 7 T Biospec 70/30 MR (Bruker), z cylindryczną cewką nadawczą o częstotliwości radiowej (o średnicy wewnętrznej 8.6 cm) i cewką odbiorczą (2x2 elementów) umieszczoną nad głową zwierzęcia. Przed infuzją komórek, podczas ich transplantacji i bezpośrednio po przeszczepieniu oraz 24, 48 i 72 godziny od podania komórek mózgi zwierząt były obrazowane za pomocą sekwencji T2 (RARE, TR = 4000 ms, TE = 58.5 ms, TA = 2 m 8 s, FOV = 2.69/2.35, MTX = 256/128) w celu uwidocznienia obszaru uszkodzenia oraz z użyciem sekwencji T2* (FLASH, TR = 500 ms, TE = 5 ms, FA = 40 deg, TA = 48 s, FOV = 2.69/2.35, MTX = 256/128) w celu wykrycia obecności przeszczepionych komórek. Przeszczepione hBM-MSCs obecne w mózgu oceniano na podstawie intensywności sygnału pochodzącego od znacznika Molday ION Rhodamine B™, użytego do wyznakowania komórek przed ich transplantacją. Przy pomocy narzędzia „wielokąt” w programie Image J obramowano obszar obejmujący lewą półkulę mózgu (LH), a następnie w analogiczny sposób oznakowano obszar prawej półkuli mózgu (RH) szczura przed (przed Tx) i po przeszczepie (po Tx) hBM-MSCs i zmierzono średnie natężenie sygnału w obrębie oznaczonych obszarów. Zmiana wartości natężenia sygnału spowodowana napływem komórek została obliczona przy użyciu wzoru [przed: (Tx LH- przed Tx RH)] - [(po: (Tx LH- po Tx RH)].

Do analizy wykorzystano grupę 12 zwierząt (6 zwierząt z przeszczepionymi natywnymi hBM-MSCs i 6 zwierząt z przeszczepionymi komórkami transfekowanymi mRNA ITGA4). W przypadku każdego zwierzęcia analizowano 5 przekrojów poprzecznych przez mózg na wysokości odpowiadającej obecności struktur jąder prążkowiego mózgu.



Ryc. 12. Schemat eksperymentu oceniającego zdolność do zasiedlenia uszkodzonych obszarów mózgu przez podane dotętniczo kontrolne i wykazujące nad-ekspresję białka $\alpha 4$ hBM-MSCs.

9. Pobieranie materiału do badań

W celu wykonania analizy lokalizacji przeszczepionych dotętniczo modyfikowanych mRNA ITGA4 i kontrolnych hBM-MSCs u szczurów z wywołanym podaniem ouabainy uszkodzeniem mózgu post mortem, od zwierząt po ich uśmierceniu izolowano mózgi. W celu pobrania materiału, 24, 48 i 72 godziny po przeszczepie komórek hBM-MSCs szczury były poddane głębokiej narkozie izofluranowej i dekapitowane. Wyizolowane mózgi zwierząt mrożono w suchym lodzie i przechowywano w temp. -70°C do momentu krojenia preparatów. Przed wykonaniem skrawków, zamrożone mózgi szczurów przenoszono do kriostatu, ogrzewano do temperatury -20°C i krojono w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości $25\ \mu\text{m}$, które umieszczano na szkiełkach podstawowych. Po wysuszeniu skrawki analizowano metodami immunohistochemicznymi.

4.20. Analiza immunohistochemiczna skrawków mózgu szczura

Analiza immunocytochemiczna miała na celu detekcję przeszczepionych komórek hBM-MSCs w mózgach szczurów. Reakcje immunohistochemiczne przeprowadzono na skrawkach mózgow zwierząt, poddanych uszkodzeniu prążkowiego mózgu ouabainą i transplantacji hBM-MSCs natywnych lub transfekowanych mRNA ITGA4, stosując I-rzędowe przeciwciała specyficzne dla określonych markerów oraz przeciwciała II-rzędowe sprzężone z fluorochromami. Przed inkubacją z I-rzędowym przeciwciałem, przeprowadzono utrwalanie skrawków poprzez 15 minutową inkubację w 4 % roztworze PFA w PBS, a po trzykrotnym płukaniu PBS permeabilizację błon komórkowych i blokowanie wiązań nieswoistych (0.25 % Triton X-100 oraz 10 % surowica koziej i 1 % BSA, w PBS) przez 90 min w temperaturze pokojowej. Reakcje z przeciwciałami I-rzędowymi: mysie IgG1 anty-CD44; -ED1; -Klaudyna-5 i królicze poliklonalne anty-Laminina (Tabela 2), przeprowadzono inkubując skrawki mózgu w temperaturze 4°C przez całą noc. Dla rozwinięcia reakcji barwnych zastosowano odpowiednie przeciwciała II-rzędowe sprzężone ze znacznikami fluorescencyjnymi: kozie anty-mysie IgG1 Alexa Fluor 488; kozie anty-mysie IgG1 Alexa Fluor 546; kozie anty-królicze IgG Alexa Fluor 633 (Tabela 3). Procedurę barwienia przeprowadzono przez 60 min w ciemności w temperaturze pokojowej. Dodatkowo, jądra komórek barwiono $5\ \mu\text{M}$ roztworem Hoechst 33258 (Sigma) przez 5 minut. Po odpłukaniu niezwiązanych przeciwciał preparaty zamykano przy użyciu Fluorescence Mounting Medium (Dako). Jako kontrole specyficzności zastosowanych przeciwciał wykonano powyższą procedurę barwienia skrawków mózgu z pominięciem I-rzędowego przeciwciała.

4.21. Wizualizacja obrazów w mikroskopie konfokalnym

Wyniki badań immunohistochemicznych analizowano w mikroskopie konfokalnym (Zeiss LSM 780) wyposażonym w lasery: argonowy (488 nm), który służył do wzbudzenia zielonego barwnika Alexa Fluor 488; ciałą stałego (561 nm), wykorzystywanym do wzbudzenia czerwonego barwnika Alexa Fluor 546; helowo-neonowy (633 nm), który służył do wzbudzenia czerwonego barwnika Alexa Fluor 633 oraz diodę (405 nm) wykorzystywaną do wzbudzenia niebieskiego barwnika Hoechst 33258. W celu kwantyfikacji wyników otrzymanych technikami immunocytochemicznymi wykonywano skany całej prawej półkuli mózgu przy użyciu polecenia „tile scans” i określano liczbę komórek pozytywnych dla danego markera w obrębie wszystkich komórek wykazujących fluorescencję w zakresie widma o długości fali wzbudzenia 546 nm, pochodzącego od znacznika Molday ION, którym barwiono hBM-MSCs przed podaniem dotętniczym. Wszystkie komórki wyznakowane Molday ION obecne w mózgu przyjęto za 100 % populacji. Liczenie komórek odbywało się manualnie w programie ZEN 2012 blue (Zeiss). Obrazy typu *tile scan* zbierano w mikroskopie Axio Observer Z.1 i analizowano w systemie *ZEN blue*.

4.22. Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki liczbowe poddane zostały analizie statystycznej. W przypadku danych liczbowych pochodzących z eksperymentów Real Time PCR przedstawiono je, jako wartości średnie \pm SEM z trzech doświadczeń wykonanych w trzech powtórzeniach. W celu oceny statystycznej istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test wielokrotnych porównań Bonferroniego. Do wszystkich obliczeń stosowano program GraphPad. Poziom istotności mniejszy niż 0.05 przyjęto za statystycznie znamienne. W przypadku pozostałych doświadczeń obliczenia statystyczne (z wyjątkiem korelacji) przeprowadzono stosując program PROC MIXED (SAS 9.4). Do określenia istotności statystycznej użyto testu typu III efektów stałych, a do porównania użyto metody różnicy najmniejszych kwadratów błędów (LMS). W przypadkach uzasadnionych strukturą danych zastosowano wielopoziomowe hierarchiczne modele mieszane ze zmiennymi losowymi i stałymi. Jeśli w modelu pojawiała się więcej niż jedna zmienna, zastosowano regresję wielowymiarową, aby uzyskać określony typ zmiennych w celu lepszego zrozumienia źródeł zmienności. Korelacje obliczono przy użyciu współczynnika r Pearson'a wbudowanego w PROC CORR (SAS 9.4). Poziom istotności statystycznej ustalono na $p < 0.05$: $p < 0.05$ (*); $p < 0.01$ (**); $p < 0.001$ (***). Wartości bezwzględne zaprezentowano jako wykresy pudełkowe z górną i dolną granicą pola pierwszego i trzeciego kwartyla, a medianę naniesiono jako linię wewnątrz pudełka. Wąsy wykresów rozciągają się od pudełka do linii granicznej, która mieści się w przedziałach rozstępu międzykwartylowego ± 1.5 . Punkty danych poza liniami granicznymi są uznawane za obserwacje odstające i są wyświetlane, jako okręgi. Koła lub kwadraty wewnątrz pudełka wskazują wartość średnią. Wartości względne (procentowe) są przedstawione, jako wykresy kołowe.

5. WYNIKI BADAŃ

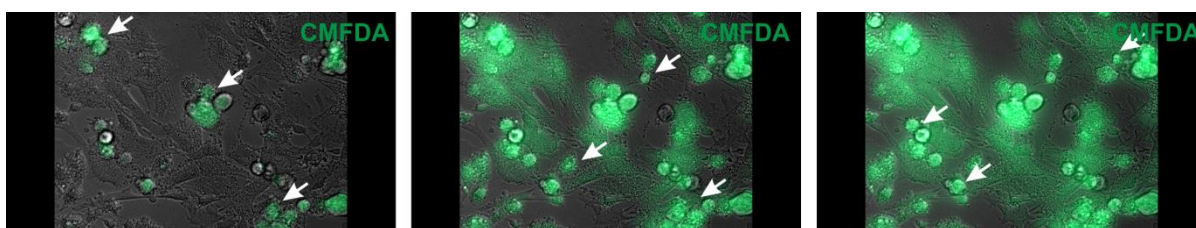
I etap moich badań dotyczył oceny przydatności wybranych przyżyciowych markerów zastosowanych do znakowania komórek hBM-MSCs do użytku w dalszych eksperymentach *in vitro* i *in vivo*. Prowadzone badania obejmowały analizę porównawczą wpływu trzech typów znaczników: CellTracker™ Green CMFDA (Life Technologies, CMFDA), mRNA eGFP (Stemgent) i Molday ION (BiOPAL, Molday) na morfologię i funkcje znakowanych hBM-MSCs. Istotą tych badań było wytypowanie przyżyciowego znacznika optymalnego dla hBM-MSCs, który nie zmieniałby cech biologicznych znakowanych komórek, a jednocześnie umożliwiłby ich identyfikację w długoczasowych eksperymentach prowadzonych zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*.

5.1. Ocena właściwości biologicznych hBM-MSCs *in vitro*, po znakowaniu komórek wybranymi barwnikami przyżyciowymi

Wpływ znaczników CMFDA, mRNA eGFP lub Molday ION na hBM-MSCs był oceniany w warunkach hodowli *in vitro*. hBM-MSCs znakowane tymi barwnikami badano pod kątem cech morfologicznych, aktywności metabolicznej, ekspresji genów na poziomie mRNA kodujących wybrane czynniki wzrostu zaangażowane w proces neurogenezy i regeneracji tkanki nerwowej oraz zdolności hBM-MSCs do wielokierunkowego różnicowania w 3 typy komórek mezodermalnych.

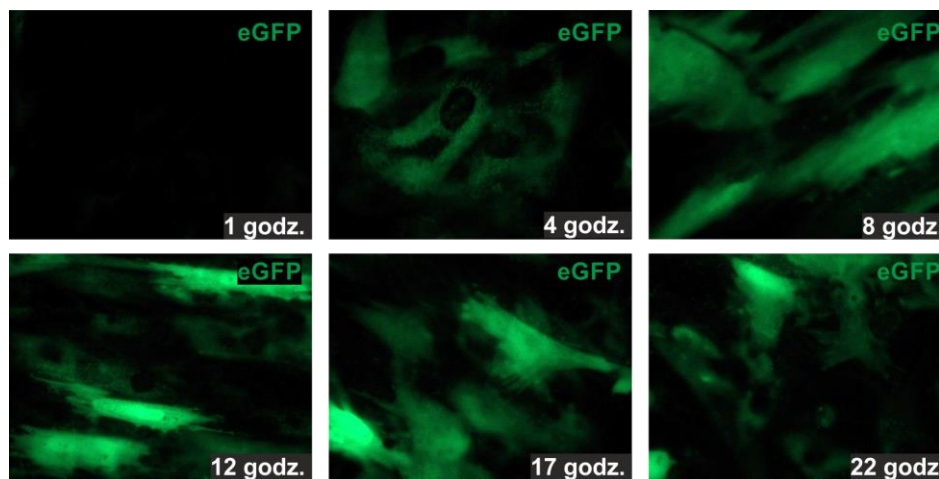
5.1.1. Optymalizacja znakowania hBM-MSCs w celu ich obrazowania w warunkach *in vitro* i *in vivo*

Przeprowadzone przeze mnie wstępne badania miały za zadanie optymalizację protokołów znakowania hBM-MSCs dla każdego z wybranych znaczników przyżyciowych. W przypadku CMFDA (ang. *5-chloromethylfluorescein diacetate*) okazało się, że optymalnymi warunkami do wyznakowania komórek hBM-MSCs jest inkubacja w pożywce Opti-MEM® I Reduced Serum Medium z dodatkiem CMFDA w stężeniu 2 nM przez okres 40 min. Przyżyciowa obserwacja procesu znakowania wykazała, że w przypadku przedłużania czasu trwania inkubacji hBM-MSCs z CMFDA dochodzi do szybkiego obkurczania i odklejania znakowanych komórek (ryc. 13).



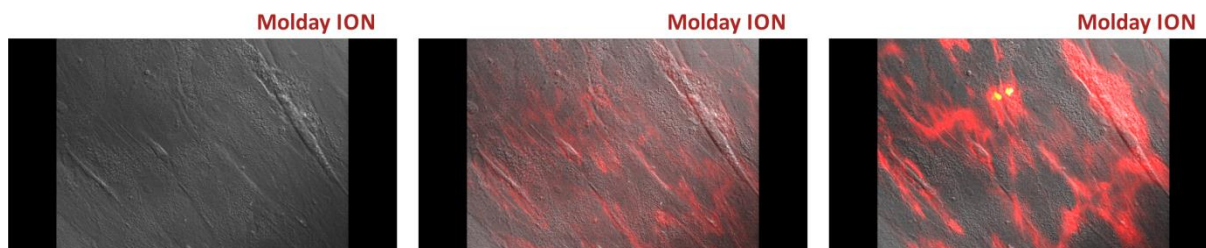
Ryc. 13. Zdjęcia stanowią ujęcia nagrania procesu znakowania hBM-MSCs znacznikiem fluorescencyjnym CMFDA. Strzałki wskazują na komórki, które podczas procesu znakowania obkurczyły się i odkleiły od dna naczynia hodowlanego. Powiększenie x20.

W przypadku znakowania hBM-MSCs eGFP, którego istotą jest wprowadzenie do komórek transkryptu mRNA eGFP na drodze transfekcji, optymalizacja protokołu pozwoliła uzyskać wysoką wydajność transfekcji komórek przy użyciu mRNA eGFP i Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent. Podczas przyżyciowej obserwacji przebiegu transfekcji okazało się, że już w czwartej godzinie inkubacji komórek hBM-MSCs z odczynnikami transfekcyjnymi białko eGFP jest obecne w komórkach. Zielona fluorescencja najpierw pojawia się w obrębie jądra komórkowego, a następnie w cytoplazmie transfekowanych komórek. W ciągu kolejnych godzin transfekcji sygnał fluorescencyjny wzrasta. Po 12 godzinach inkubacji niemal we wszystkich komórkach widoczne jest białko eGFP (ryc. 14).



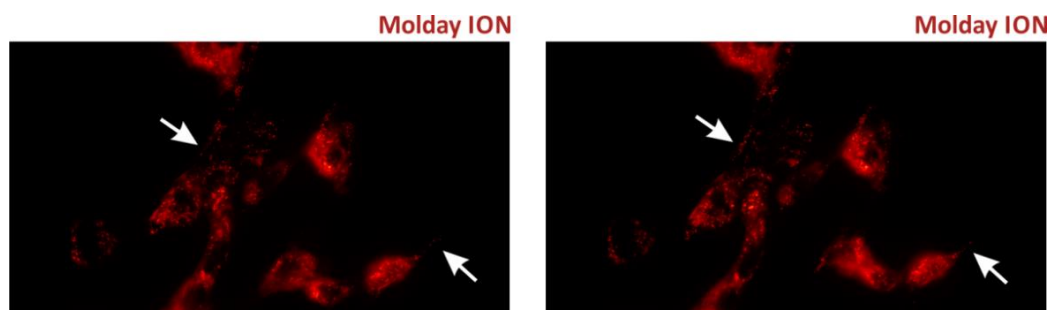
Ryc. 14. Zdjęcia stanowią ujęcia nagrania procesu transfekcji hBM-MSCs mRNA eGFP w kolejnych punktach czasowych od jego rozpoczęcia. Powiększenie x20.

Kolejnym testowanym przez nas znacznikiem przyżyciowym był Molday ION, zawierający nanocząstki tlenku żelaza połączone z rodaminą B. Podczas wstępnych prób znakowania hBM-MSCs okazało się, że komórki mogą być z powodzeniem znakowane Molday ION w pożywce standardowo używanej do hodowli hBM-MSCs, co jest zaletą tego odczynnika w stosunku do innych wyżej opisywanych barwników, które wymagają stosowania pożywek bezsurowiczych. Przyżyciowa obserwacja procesu wnikania cząsteczek Molday ION do hBM-MSCs ujawniła, że po 15 minutach znacznik znajduje się w błonie komórkowej (ryc.15).



Ryc. 15. Zdjęcia stanowią ujęcia nagrania procesu znakowania hBM-MSCs znacznikiem Molday ION w ciągu pierwszych 15 min od jego podania do pożywki komórek. Powiększenie x40.

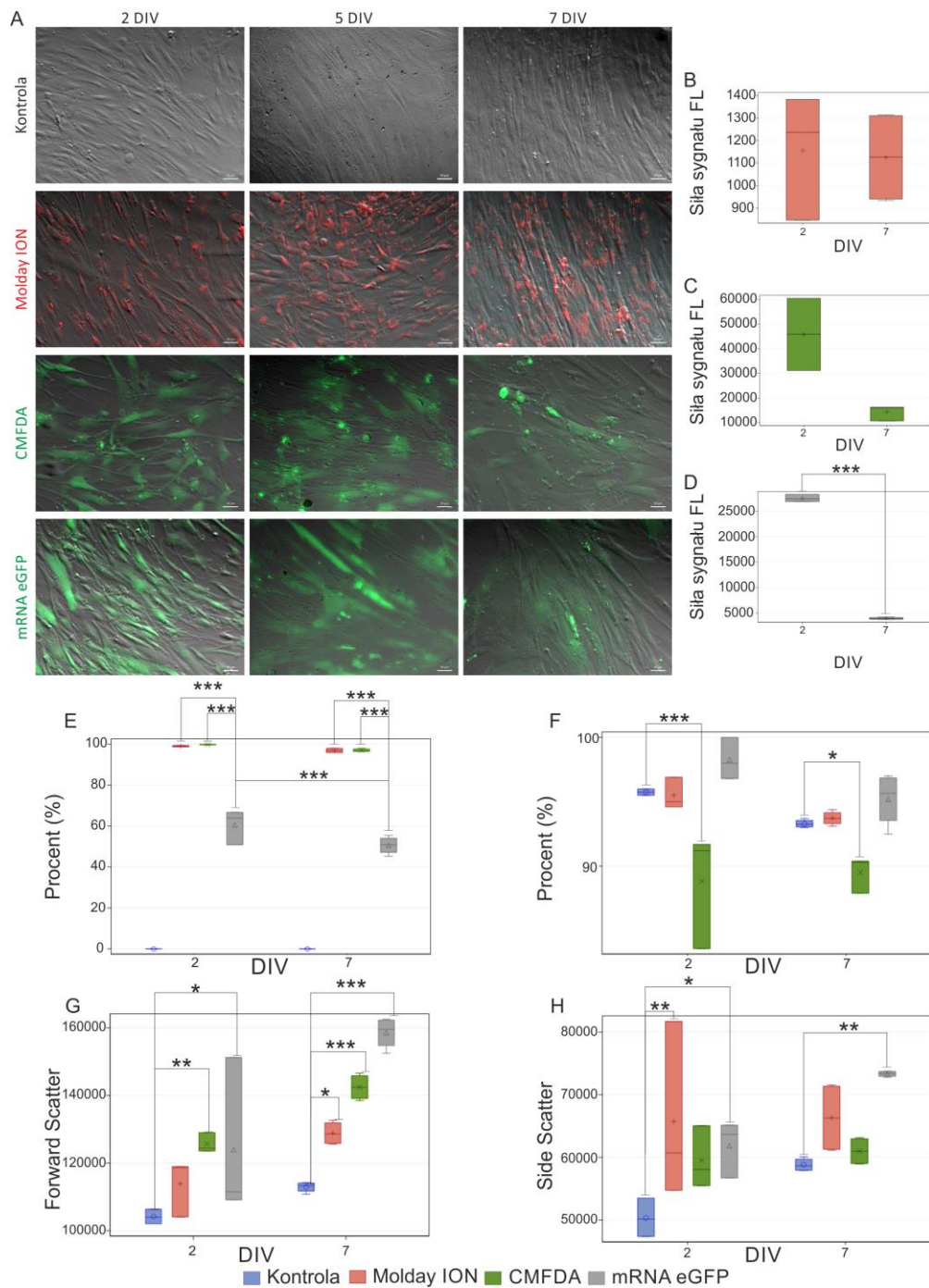
Jest to widoczne w mikroskopie fluorescencyjnym i konfokalnym w postaci pierścieni otaczających komórki. W ciągu kolejnych 18 godzin od znakowania Molday ION wnika do wnętrza komórki i formuje w cytoplazmie agregaty, które zmieniają swoje położenie podczas ruchu komórki (ryc. 16).



Ryc. 16. Zdjęcia stanowią kolejne ujęcia nagrania hodowli in vitro hBM-MSCs wyznakowanych znacznikiem Molday ION w ciągu kolejnych 10 min obserwacji. Strzałki wskazują na przemieszczające się agregaty znacznika w cytoplazmie komórek. Powiększenie x40.

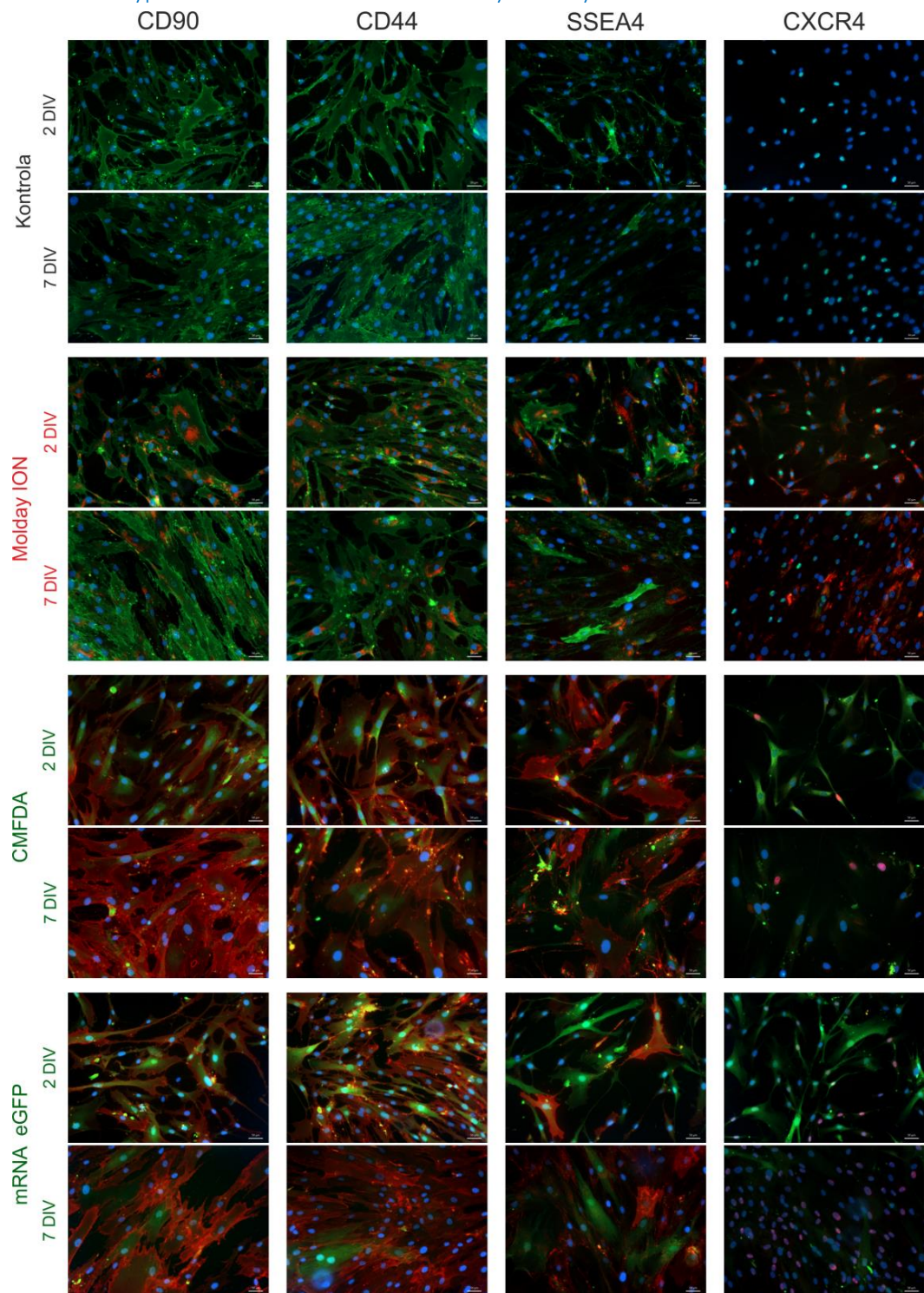
5.1.2. Ocena morfologii hBM-MSCs znakowanych wybranymi barwnikami

Podczas przyżyciowych obserwacji hBM-MSCs barwionych CMFDA okazało się, że znakowane komórki wykazują zmiany morfologiczne podczas długotrwałej hodowli (ryc. 17A). Po 7 dniach hodowli *in vitro* niektóre z hBM-MSCs znakowanych CMFDA obkurczają się, przyjmując okrągły kształt zamiast typowego dla komórek mezenchymalnych wrzecionowatego kształtu i odklejają się od podłoża. Komórki hBM-MSCs poddane transfekcji mRNA eGFP lub zawierające Molday ION wykazywały w hodowli prawidłowe cechy morfologiczne. hBM-MSCs znakowane Molday ION zachowywały intensywność sygnału fluorescencyjnego przez 7 dni od znakowania (ryc. 17B), natomiast w przypadku hBM-MSCs wyznakowanych za pomocą CMFDA lub transfekowanych eGFP, zauważono spadek intensywności sygnału fluorescencji pomiędzy drugim a siódmym dniem od znakowania, odpowiednio o 69 % i 86 % (ryc. 17 C, D). Analiza metodą cytometrii przepływowej wykazała, że niemal wszystkie hBM-MSCs znakowane Molday ION wykazywały fluorescencję po 2 i po 7 dniach od znakowania, odpowiednio 99.0 ± 0.29 % i 97.0 ± 0.66 %. Wśród populacji hBM-MSCs transfekowanych mRNA eGFP odsetek komórek fluorescencyjnych był znacznie niższy i wynosił 60.0 ± 6.93 % po 2 dniach oraz 51.0 ± 3.83 % po 7 dniach od transfekcji (ryc. 17E). Żywotność hBM-MSCs wyznakowanych za pomocą CMFDA była znacząco niższa po 2 i 7 dniach hodowli, odpowiednio 88.0 ± 3.71 % i 89.5 ± 1.16 % niż w przypadku kontrolnych hBM-MSCs lub komórek znakowanych Molday ION w porównaniu do hBM-MSCs transfekowanych mRNA eGFP, odpowiednio: 95.75 ± 0.2 % vs 95.5 ± 1.0 % vs 98.27 ± 1.81 po 2 dniach oraz 93.3 ± 0.27 % vs 93.73 ± 0.48 % vs 95.2 ± 1.81 po 7 dniach w hodowli (ryc. 17F). W celu wykonania dalszej analizy wpływu znakowania na hBM-MSCs, komórki należące do poszczególnych grup oceniano pod względem ich wielkości i ziarnistości. Wartości względnej wielkości hBM-MSCs wyznakowanych wszystkimi trzema znacznikami przyżyciowymi były znacznie wyższe po 7 dniach obserwacji w porównaniu do danych uzyskanych dla komórek kontrolnych nieznakowanych. Wartości „FSC” wynosiły odpowiednio: $128\ 856.5 \pm 305.65$ dla hBM-MSCs znakowanych Molday ION Rhodamine; $142\ 477.0 \pm 3\ 431.88$ dla hBM-MSCs wyznakowanych za pomocą CMFDA; $158\ 542.25 \pm 4\ 099.13$ dla komórek transfekowanych mRNA eGFP oraz $112\ 877.5 \pm 1\ 372.43$ dla kontrolnych, nieznakowanych hBM-MSCs (ryc. 17G). Zmianom wielkości komórek towarzyszyły zmiany wartości „SSC” określających ziarnistość komórek. Wartości „SSC” były wyższe dla komórek znakowanych Molday ION i hBM-MSCs transfekowanych mRNA eGFP po 7 dniach hodowli *in vitro* w porównaniu z komórkami nieznakowanymi i wynosiły odpowiednio: $66\ 315.0 \pm 5\ 039.17$ dla komórek znakowanych Molday ION; $73\ 329.25 \pm 405.07$ dla komórek transfekowanych mRNA eGFP; oraz $58\ 814.75 \pm 925.89$ dla kontrolnych hBM-MSCs (ryc. 17H).



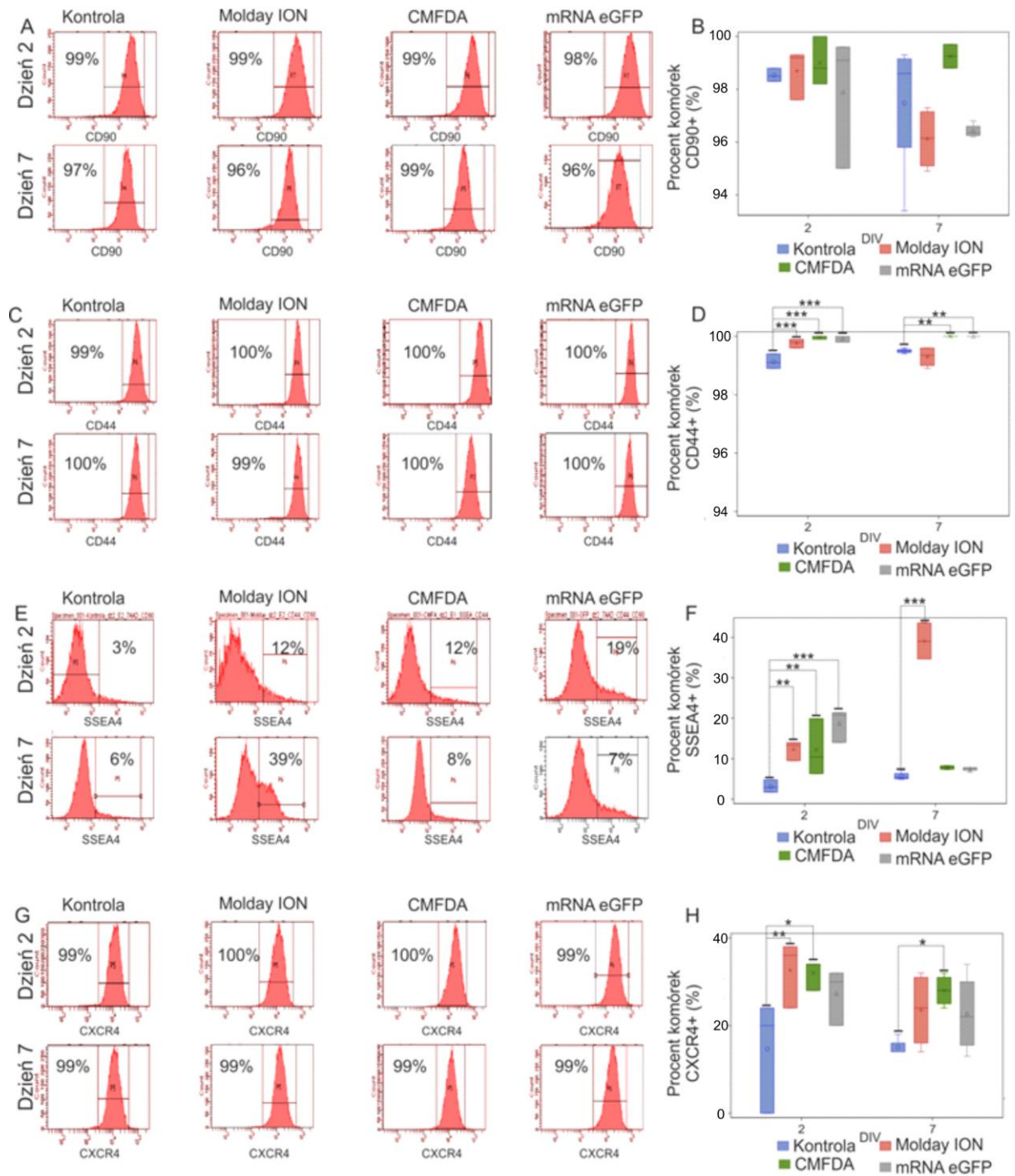
Ryc. 17. Komórki hBM-MSCs hodowane *in vitro* wybarwione przyżyciowo znacznikami: Molday ION, CMFDA lub transfekowane mRNA eGFP oraz hBM-MSCs niezakowane. (A) Obraz widoczny w mikroskopie fluorescencyjnym w 2, 5 i 7 dniu obserwacji od momentu znakowania. *DIV – dzień w hodowli *in vitro*; *FL – fluorescencja. Skala 50 μ m, powiększenie x20. Pomiar natężenia sygnału fluorescencji generowanego przez komórki znakowane (B) Molday ION (Molday ION), (C) CMFDA (CMFDA) i (D) transfekowane mRNA eGFP (mRNA eGFP) w drugim i siódmym dniu od znakowania. (E) Porównanie odsetka fluorescencyjnych hBM-MSC we wszystkich grupach znakowanych komórek. (F) Ocena żywotność znakowanych komórek przy użyciu testu 7AAD w drugim i siódmym dniu od znakowaniu (F). Pomiar względnej wielkości - wartości FSC (G) i ziarnistości – wartości SSC (H) dla komórek znakowanych Molday ION, CMFDA oraz transfekowanych mRNA eGFP w odniesieniu do kontrolnych niezakowanych hBM-MSCs. Do określenia istotności statystycznej użyto testu typu III efektów stałych, a do porównania metody LMS. Wykresy pudełkowe prezentują rozproszenie i kształt rozkładu danych dla wartości średniej badanej cechy w porównywanych populacjach. Długość przedstawionych słupków jest równa rozstępowi ćwiartkowemu (Q1-Q3) danych, końcówki wąsów wskazują wartości minimalną i maksymalną, linia wewnątrz słupka wyznacza medianę, natomiast koło średnią arytmetyczną, wartości odstające są przedstawione w postaci okręgów. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (n=3-4)

5.1.3. Ocena fenotypu komórek hBM-MSCs znakowanych różnymi barwnikami



Ryc. 18. Komórki hBM-MSCs hodowane *in vitro* wybarwione przyżyciowymi znacznikami: Molday ION, CMFDA lub transfekowane mRNA eGFP oraz hBM-MSCs nieznakowane. Analiza immunocytochemiczna po zastosowaniu przeciwciał skierowanych przeciwko białkom: CD90, CD44, SSEA-4 oraz CXCR4. Obraz w mikroskopie fluorescencyjnym z hodowli *in vitro* w 2-gim i 7-mym dniu od znakowania. Skala 50 μm , powiększenie x10.

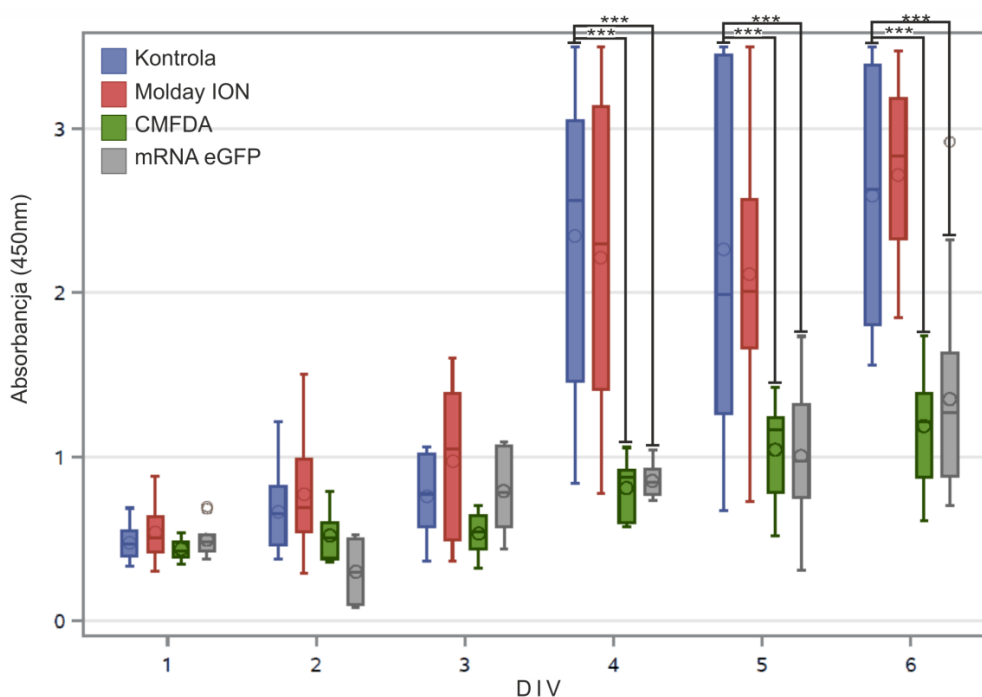
Badania immunocytochemiczne hBM-MSCs znakowanych CMFDA, eGFP lub Molday ION z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko wybranym markerom specyficznym dla komórek mezenchymalnych (CD90; CD44), białkom świadczącym o wczesnym etapie rozwojowym komórek (SSEA-4) oraz molekułom zaangażowanym w proces migracji (CXCR4) nie wykazały różnic w ekspresji badanych białek w obrębie populacji komórek znakowanych poszczególnymi barwnikami podczas ich 7-dniowej obserwacji *in vitro* (ryc. 18). Analiza cytometryczna komórek hBM-MSCs wyznakowanych Molday ION, CMFDA lub transfekowanych mRNA eGFP wykazała, że wyznakowane komórki zachowały swój podstawowy fenotyp z jedynie niewielkimi zmianami w porównaniu do komórek nieznakowanych – kontrolnych (ryc. 19). Poziom ekspresji markerów CD90 i CD44 pozostawał we wszystkich grupach znakowanych komórek na wysokim poziomie. Niemal wszystkie znakowane hBM-MSCs wykazywały ekspresję obydwu wymienionych antygenów na swojej powierzchni w 2-gim i 7-mym dniu od znakowania komórek (ryc. 19 A-D). Co ciekawe, zaobserwowano wzrost ekspresji białka SSEA4 w hBM-MSCs znakowanych Molday ION i CMFDA oraz transfekowanych mRNA eGFP w porównaniu do komórek nieznakowanych po 2 dniach od znakowania, odpowiednio: 12.0 ± 1.98 %; 1.0 ± 5.7 %; 19.0 ± 3.36 % vs 3.0 ± 3.36 %. Ponadto, w grupie komórek znakowanych Molday ION obserwowano dalszy wzrost odsetka komórek SSEA4-dodatnich, który po 7 dniach wynosił 39.0 ± 4.48 % (ryc. 19 E,F). W analizie wykonanej przy pomocy cytometrii przepływowej wykazano, że wszystkie hBM-MSCs znakowane Molday ION, CMFDA lub transfekowane mRNA eGFP zachowywały wysoką ekspresję receptora CXCR4 obserwowaną również w komórkach kontrolnych w obu analizowanych punktach czasowych (ryc. 19 G,H).



Ryc. 19. Analiza fenotypu hBM-MSCs w 2-gim i 7-mym dniu hodowli *in vitro* od znakowania za pomocą Molday ION, CMFDA oraz po transfekcji mRNA eGFP w porównaniu do komórek kontrolnych nieznakowanych. W badaniu wykorzystano przeciwciała skierowanych przeciwko białkom: CD90, CD44, SSEA4 i CXCR4. Wykresy słupkowe przedstawiają porównanie odsetka hBM-MSCs wykazujących ekspresję CD90 (B), CD44 (D), SSEA4 (F) oraz CXCR4 (H) w poszczególnych grupach komórek. Do określenia istotności statystycznej użyto testu typu III efektów stałych, a do porównania metody LMS. Wykresy pudełkowe prezentują rozproszenie i kształt rozkładu danych dla wartości średniej badanej cechy w porównywanych populacjach. Długość przedstawionych słupków jest równa rozstępowi ćwiartkowemu (Q1-Q3) danych, końcówki wąsów wskazują wartości minimalną i maksymalną, linia wewnątrz słupka wyznacza medianę, natomiast koło średnią arytmetyczną, wartości odstające są przedstawione w postaci okręgów. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 (n=3-4)

5.1.4. Wpływ znakowania hBM-MSCs wybranymi barwnikami na aktywność metaboliczną komórek

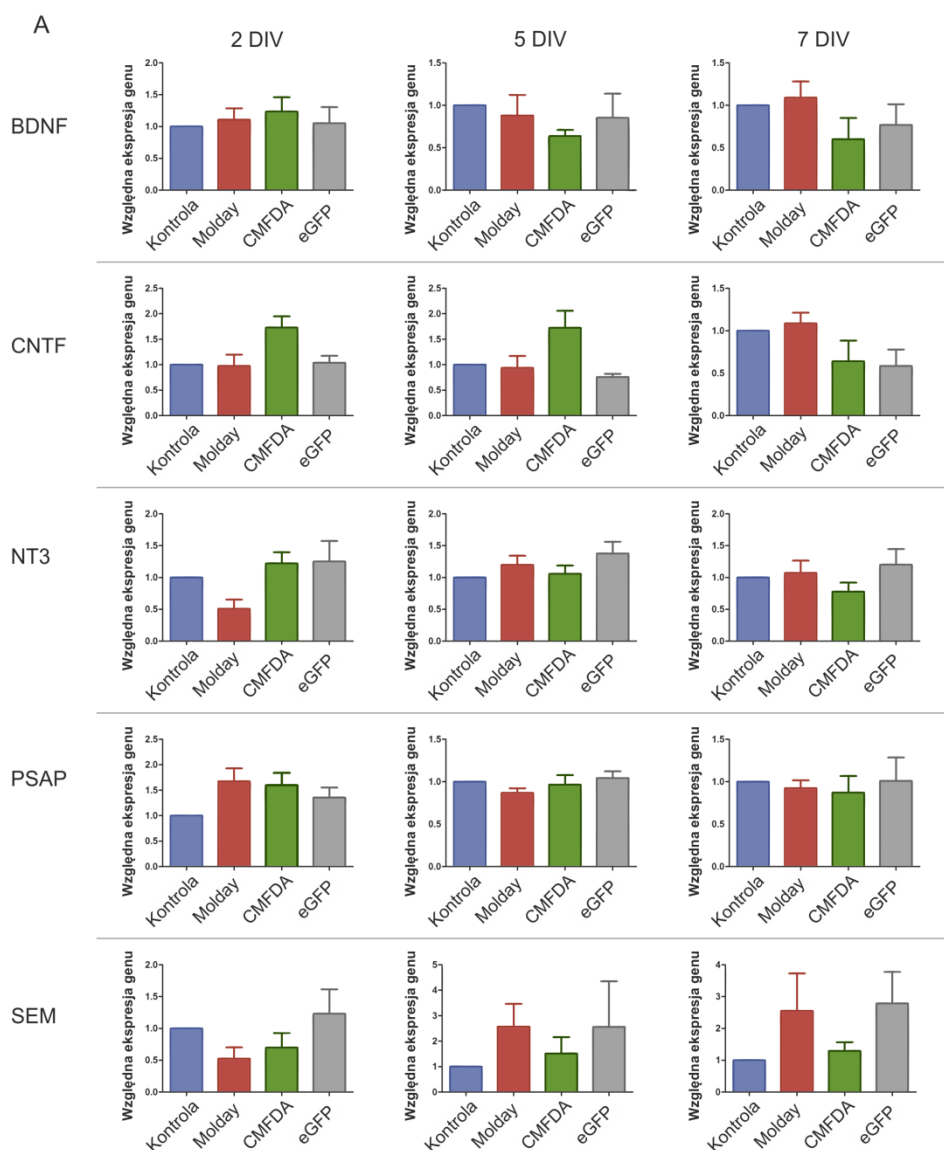
Aktywność metaboliczna hBM-MSCs znakowanych CMFDA, Molday ION lub transfekowanych mRNA eGFP była oceniana w sekwencji czasowej przez 6 kolejnych dni. Kontrolne nieznakowane hBM-MSCs charakteryzowały się określonym wzorem aktywności metabolicznej. W ciągu pierwszych 3 dni hodowli następował powolny wzrost aktywności metabolicznej komórek, po którym pojawiał się jego gwałtowny wzrost w czwartym dniu, i dalszy łagodny przyrost w kolejnych dniach obserwacji. hBM-MSCs znakowane Molday ION wykazywały taki sam przebieg zmian aktywności metabolicznej jak komórki kontrolne. W żadnym punkcie czasowym obserwacji nie zanotowano znamiennej istotnych statystycznie różnic pomiędzy tymi populacjami komórek. W przypadku hBM-MSCs znakowanych CMFDA lub transfekowanych mRNA eGFP poziom aktywności metabolicznej komórek w pierwszych 3 dniach hodowli był porównywalny z aktywnością hBM-MSCs kontrolnych, natomiast nie obserwowano typowego dla komórek nieznakowanych gwałtownego wzrostu aktywności w czwartym dniu hodowli. Aktywność metaboliczna hBM-MSCs znakowanych CMFDA lub eGFP w 3 ostatnich dniach hodowli była statystycznie niższa, zarówno w porównaniu z komórkami kontrolnymi jak i znakowanymi Molday ION (ryc. 20)

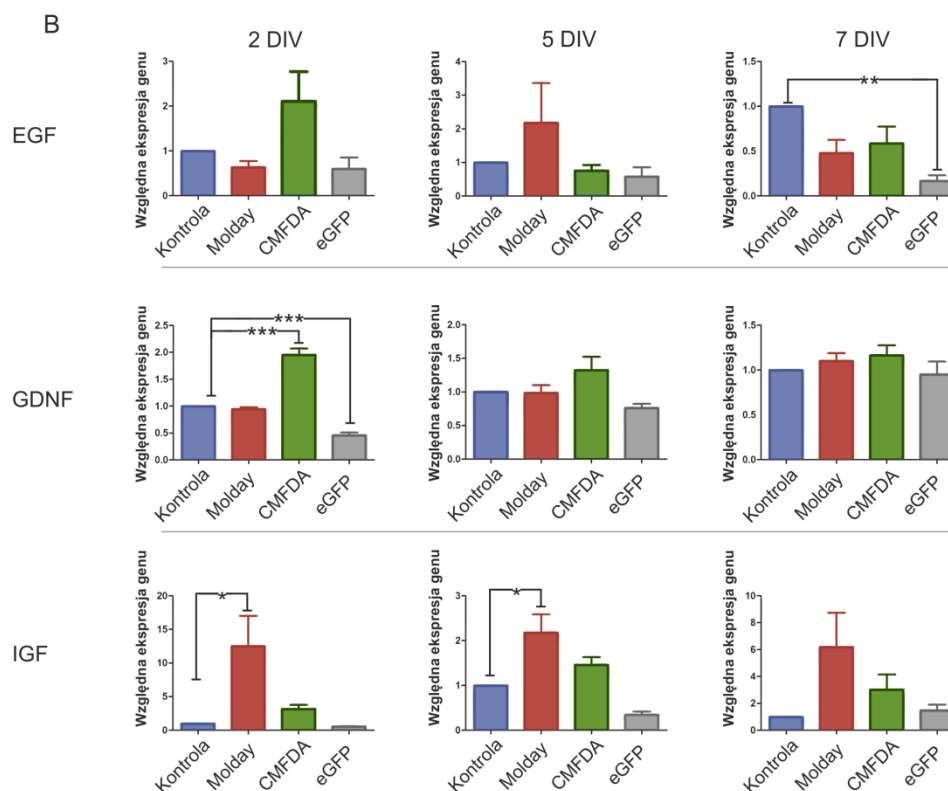


Ryc. 20. Wykres przedstawia pomiar aktywności metabolicznej hodowanych in vitro hBM-MSCs wybarwionych przyżyciowymi barwnikami: Molday ION, CMFDA lub transfekowanych mRNA eGFP oraz hBM-MSCs natywnych (nieznakowane) przez kolejne sześć dni od znakowania. Do określenia istotności statystycznej użyto testu typu III efektów stałych, a do porównania metody LMS. Wykresy pudełkowe prezentują rozproszenie i kształt rozkładu danych dla wartości badanej w porównywanych populacjach. Długość przedstawionych słupków jest równa rozstępowi ćwiartkowemu (Q1-Q3) danych, końcówki wąsów wskazują wartości minimalną i maksymalną, linia wewnątrz słupka wyznacza medianę, natomiast koło średnią arytmetyczną, wartości odstające są przedstawione w postaci okręgów. *p < 0.05, **p < 0.01*, ***p < 0.001 (n=5)

5.1.5. Analiza poziomu transkryptów kodujących wybrane czynniki wzrostu podlegające ekspresji w hBM-MSCs po wyznakowaniu komórek różnymi barwnikami przyżyciowymi

Analiza qRT-PCR poziomu ekspresji transkryptów kodujących czynniki wzrostu: BDNF, CNTF, EGF, GDNF, IGF, NT3, PSAP i SEM została przeprowadzona w hBM-MSCs niewyznakowanych i komórkach wyznakowanych Molday ION, CMFDA lub transfekowanych mRNA eGFP. Materiał zbierany był w kilku punktach czasowych hodowli komórek po 2, 5 i 7 dniach od momentu znakowania hBM-MSCs. Względny poziom ekspresji BDNF, CNTF, NT3 i PSAP w hBM-MSCs znakowanych wszystkimi barwnikami pozostawał stabilny podczas 7-dniowej obserwacji i był porównywalny z poziomem ekspresji tych czynników w komórkach natywnych (ryc.21A).





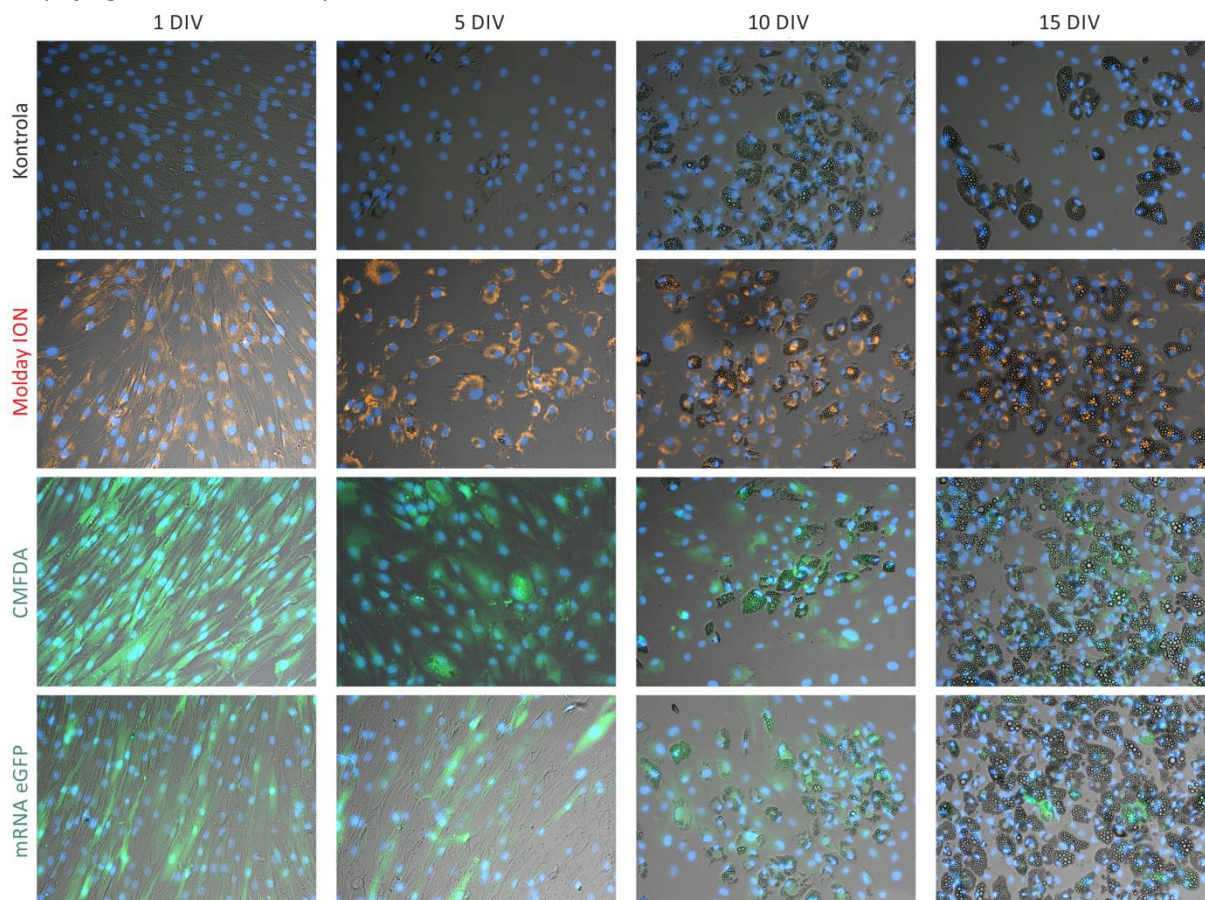
Ryc. 21. Analiza porównawcza Real Time PCR poziomu mRNA kodujących czynniki wzrostu wydzielane w drugim, piątym i siódmym dniu przez hodowane *in vitro* znakowane Molday ION (Molday), CMFDA lub transfekowane mRNA eGFP (eGFP) komórki w odniesieniu do hBM-MSCs nieznakowanych. Wyniki badań przedstawiono, jako wartości delta CT - względną ekspresję genu, czyli różnicę ekspresji badanego genu w stosunku do genu referencyjnego GAPDH. *DIV – dzień hodowli *in vitro*. W celu oceny statystycznej istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test wielokrotnych porównań Bonferroniego. Wykresy pokazują wartości średnie \pm SE, n=5-7

W przypadku GDNF zaobserwowano istotne zmiany poziomu ekspresji w drugim dniu hodowli w stosunku do kontroli, przy czym hBM-MSCs wyznakowane CMFDA wykazywały wzrost, a komórki transfekowane mRNA eGFP spadek ekspresji GDNF. Zmiany te były krótkotrwałe, poziom ekspresji GDNF badany w kolejnych dniach obserwacji nie różnił się od poziomu ekspresji w natywnych hBM-MSCs. W przypadku IGF komórki hBM-MSCs znakowane Molday ION wykazywały statystycznie znamiennej wzrost poziomu ekspresji tego czynnika podczas 2 i 5 dnia obserwacji natomiast w hBM-MSCs barwionych CMFDA lub transfekowanych mRNA eGFP poziom ekspresji IGF był porównywalny z poziomem ekspresji IGF w komórkach natywnych. W 7-mym dniu hodowli jedynie w przypadku ekspresji mRNA dla czynnika EGF jego poziom był podwyższony w komórkach transfekowanych mRNA eGFP w porównaniu do komórek natywnych (ryc.21B).

5.1.6. Wpływ znakowania hBM-MSC różnymi barwnikami na różnicowanie w kierunku 3 typów komórek wywodzących się z mezodermy

Aby ocenić czy znakowanie komórek wpływa na ich zdolność do różnicowania w kierunku komórek wywodzących się z mezodermy przeprowadzono testy stymulacji hBM-MSCs pozostających w hodowli *in vitro* do rozpoczęcia procesów adipogenezy, chondrogenyzy oraz osteogenezy. W tym celu hBM-MSCs znakowane CMFDA, Molday ION lub transfekowane mRNA eGFP były hodowane w komercyjnie dostępnych pożywkach stymulujących ich różnicowanie w określonym kierunku.

W trakcie procesu adipogenezy w hodowli hBM-MSCs obserwowano zmiany ich morfologii. Komórki przybierały gwiazdzisty kształt, w obrębie cytoplazmy pojawiały się krople tłuszczu widoczne od piątego dnia hodowli (ryc. 22).

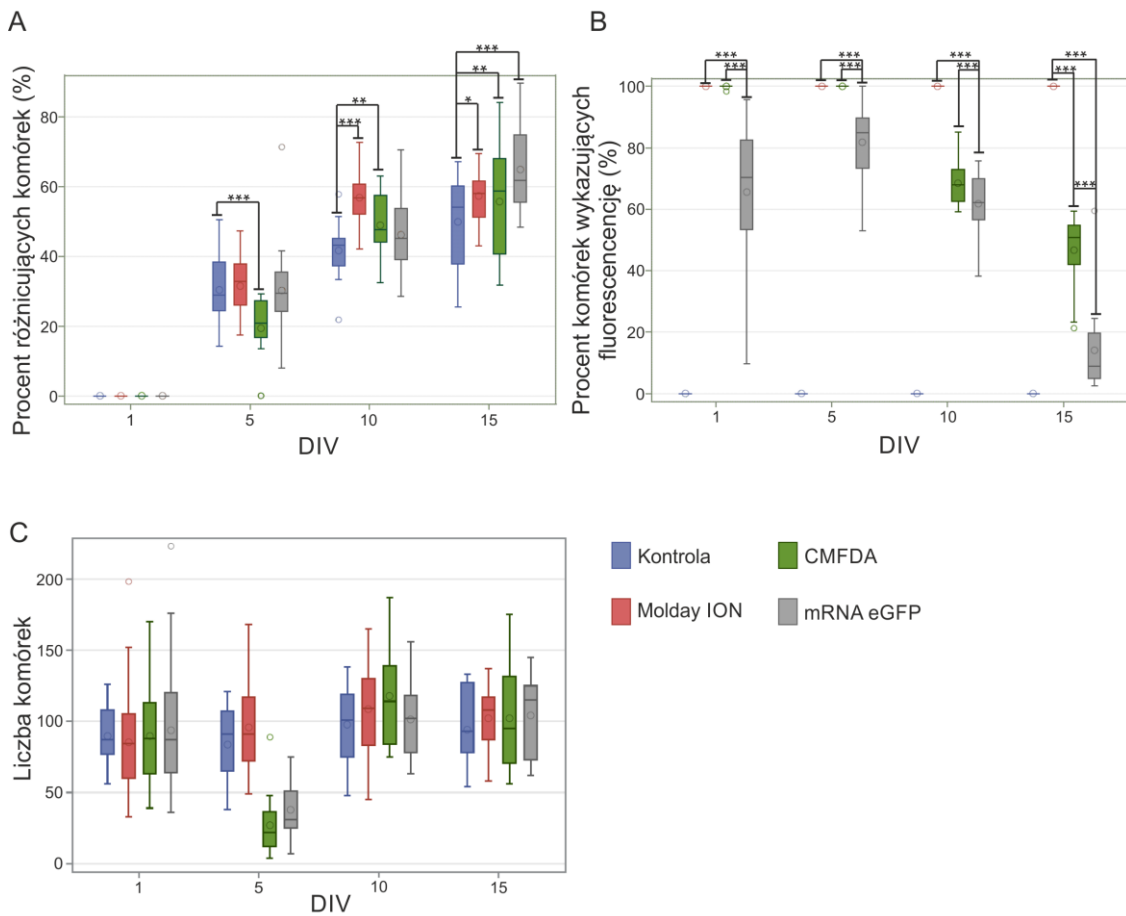


Ryc. 22. hBM-MSCs wybarwione przyżyciowymi znacznikami Molday ION, CMFDA lub transfekowane mRNA eGFP oraz hBM-MSCs natywne nieznakowane hodowane *in vitro* w pożywce stymulującej adipogenezę w 1-szym, 5-tym, 10-tym i 15-tym dniu różnicowania, obraz z mikroskopu fluorescencyjnego, powiększenie $\times 10$. *DIV – dzień hodowli *in vitro*.

Wśród wszystkich badanych grup hBM-MSCs, zarówno kontrolnych jak i znakowanych CMFDA, eGFP czy Molday ION procent komórek podlegających różnicowaniu wzrastał stopniowo od piątego dnia obserwacji jednak odsetek populacji podlegającej różnicowaniu jak również procent hBM-MSCs, które zachowały fluorescencję był różny dla komórek znakowanych poszczególnymi barwnikami. W piątym dniu różnicowania hBM-MSCs znakowane CMFDA wykazywały niższy odsetek populacji komórek różnicujących się w adipocyty w porównaniu z kontrolą ($p < 0.001$), hBM-MSCs znakowanymi Molday ION ($p < 0.001$) lub transfekowanymi mRNA eGFP ($p < 0.001$) (ryc. 23A). Po 10 dniach hodowli w pożywce stymulującej adipogenezę odsetek hBM-MSCs zróżnicowanych w adipocyty był wyższy w populacji komórek znakowanych Molday ION ($p < 0.001$) i CMFDA ($p < 0.01$) w porównaniu do hBM-MSCs kontrolnych. W przypadku komórek transfekowanych mRNA eGFP proporcja komórek zróżnicowanych i niezróżnicowanych była porównywalna do obserwowanej w populacji hBM-MSCs nieznakowanych. Udział procentowy komórek różnicujących się w adipocyty był znamienne niższy w populacji hBM-MSCs znakowanej CMFDA ($p < 0.01$) i eGFP ($p < 0.001$) niż wśród komórek znakowanych Molday ION. Piętnastego dnia różnicowania, we wszystkich grupach hBM-MSCs znakowanych trzema barwnikami obserwowano wyższy w porównaniu do kontroli procent komórek różnicujących się w adipocyty (kontrola vs Molday ION $p < 0.05$; kontrola vs CMFDA $p < 0.01$; kontrola vs mRNA eGFP $p < 0.001$).

Najwyższy odsetek komórek różnicujących w kierunku adipocytów charakteryzował populację hBM-MSCs transfekowaną mRNA eGFP (mRNA eGFP vs Molday ION $p < 0.01$ mRNA eGFP vs CMFDA $p < 0.001$). Podczas adipogenezy w populacji hBM-MSCs znakowanych CMFDA i eGFP obserwowano zmniejszenie liczby komórek wykazujących fluorescencję. W pierwszym dniu różnicowania odsetek świecących komórek wśród hBM-MSCs transfekowanych mRNA eGFP był mniejszy niż w populacji komórek znakowanych CMFDA ($p < 0.001$) czy Molday ION ($p < 0.001$) (ryc. 23B). Co ciekawe, procent komórek wykazujących fluorescencję wzrastał w populacji hBM-MSCs transfekowanych mRNA eGFP pomiędzy pierwszym a piątym dniem różnicowania ($p < 0.001$) jednocześnie obserwowano spadek ogólnej liczby komórek, co wskazywać może na zanik tych hBM-MSCs, które wyjściowo nie uległy wyznakowaniu (ryc. 23C).

Ryc. 23. Analiza wpływu znakowania hBM-MSCs wybranymi przyżyciowymi znacznikami na proces adipogenezy.

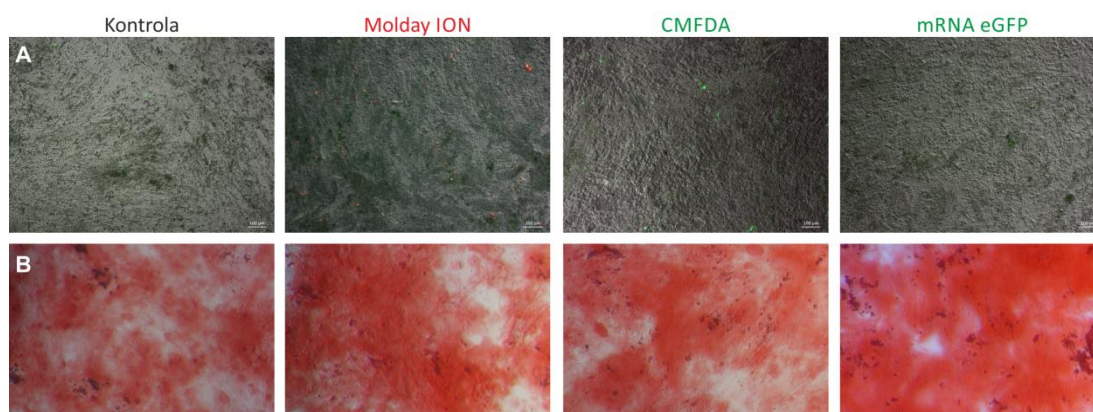


Wykres A przedstawia procentowy udział komórek różnicujących się natomiast wykres B pokazuje odsetek komórek wykazujących fluorescencję w badanych populacjach znakowanych i kontrolnych hBM-MSCs. Wykres C przedstawia generalną liczbę komórek w poszczególnych grupach hBM-MSCs w kolejnych dniach eksperymentu *DIV – dzień hodowli in vitro. Do określenia istotności statystycznej użyto testu typu III efektów stałych, a do porównania metody LMS. Wykresy pudełkowe prezentują rozproszenie i kształt rozkładu danych dla wartości badanej w porównywanych populacjach. Długość przedstawionych słupków jest równa rozstępowi ćwiartkowemu (Q1-Q3) danych, końcówki wąsów wskazują wartości minimalną i maksymalną, linia wewnątrz słupka wyznacza medianę, natomiast koło średnią arytmetyczną, wartości odstające są przedstawione w postaci okręgów. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *, *** $p < 0.001$ ($n=3$)

W piątym dniu obserwacji procent komórek zawierających barwnik fluorescencyjny w populacji hBM-MSCs transfekowanych mRNA eGFP był niższy w porównaniu z komórkami barwionymi CMFDA

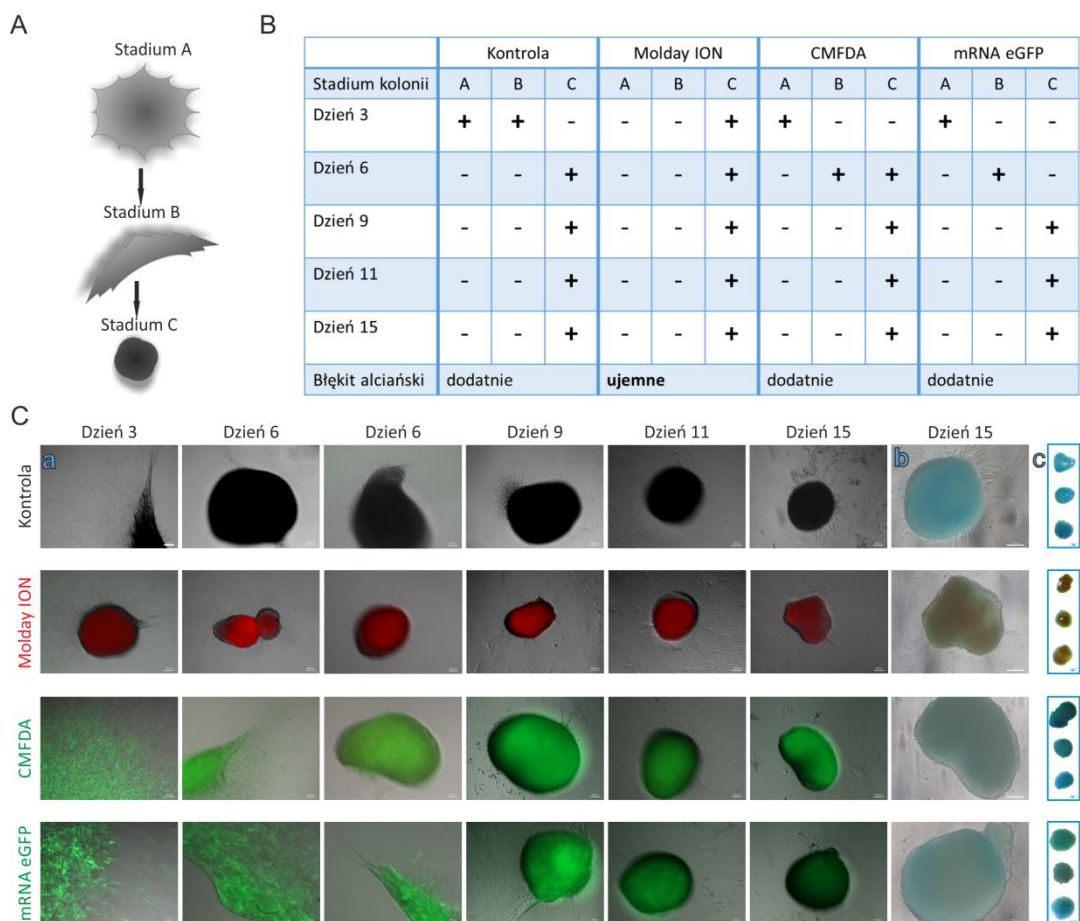
($p < 0.001$) czy Molday ION ($p < 0.001$). Po 10 dniach różnicowania zanotowano spadek liczby komórek fluorescencyjnych w populacji hBM-MSCs znakowanych CMFDA ($p < 0.001$) i eGFP ($p < 0.001$) w stosunku do udziału procentowego komórek pozytywnych obserwowanych w piątym dniu hodowli. Jednocześnie procent komórek fluorescencyjnych wśród hBM-MSCs znakowanych CMFDA ($p < 0.001$) lub eGFP ($p < 0.001$) był znacząco niższy w porównaniu do hBM-MSCs barwionych Molday ION, przy czym najmniej komórek zawierających barwnik fluorescencyjny stwierdzono wśród hBM-MSCs transfekowanych mRNA eGFP (eGFP vs CMFDA $p < 0.05$) a najwięcej w populacji hBM-MSCs znakowanych Molday ION. Tę samą zależność obserwowano także po 15 dniach różnicowania hBM-MSCs (Molday ION vs CMFDA vs mRNA eGFP $p < 0.001$). Podczas przebiegu procesu adipogenezy odsetek hBM-MSCs wykazujących fluorescencję utrzymywał się przez cały okres różnicowania na stałym poziomie w przypadku komórek znakowanych Molday ION podczas gdy w populacji hBM-MSCs barwionych CMFDA obniżał się do około 50 %, natomiast komórki transfekowane mRNA eGFP niemal całkowicie utraciły fluorescencję po 15 dniach hodowli w medium różnicującym.

Zdolność różnicowania hBM-MSCs w kierunku osteoblastów oceniano podczas hodowli komórek w pożywce stymulującej osteogenezę. Komórki znakowane CMFDA, Molday ION lub transfekowane mRNA eGFP różnicowały się w osteoblasty, co przejawiało się syntezą fosfatazy zasadowej po 21 dniach obserwacji. Niestety, hodowla hBM-MSCs barwionych wszystkimi trzema znacznikami w medium stymulującym proces osteogenezy *in vitro* spowodowała, iż komórki utraciły sygnał fluorescencyjny, który był obecny na początku eksperymentu (ryc. 24).



Ryc. 24. Analiza wpływu znakowania hBM-MSCs wybranymi znacznikami przyżyciowymi na różnicowanie w kierunku osteoblastów. (A) hBM-MSCs wybarwione przyżyciowymi znacznikami: Molday ION, CMFDA lub transfekowane mRNA eGFP oraz hBM-MSCs natywne (nieznakowane) po 21 dniach hodowli *in vitro* w pożywce stymulującej osteogenezę. Obraz z mikroskopu fluorescencyjnego (A) oraz świetlnego po barwieniu czerwiecią alirazykową (B), skala 100 μm , powiększenie $\times 10$

Badając zdolność znakowanych hBM-MSCs do różnicowania w kierunku chondrocytów komórki barwione CMFDA, Molday ION lub transfekowane mRNA eGFP hodowano w pożywce stymulującej chondrogenezę *in vitro*. Znakowane hBM-MSCs niezależnie od rodzaju barwnika formowały typowe dla chondrocytów trójwymiarowe agregaty (mikromasy), jednak dynamika tego procesu była różna w populacjach komórek barwionych poszczególnymi znacznikami. W przypadku hBM-MSCs wyznakowanych Molday ION obserwowano wcześniejsze pojawianie się typowych dla chondrogenyzy agregatów niż miało to miejsce w komórkach kontrolnych nieznakowanych czy hBM-MSCs barwionych CMFDA lub transfekowanych mRNA eGFP. Podczas zachodzącego w hBM-MSCs procesu chondrogenyzy obserwowano trzy stadia formowania mikromasy (ryc. 25A).

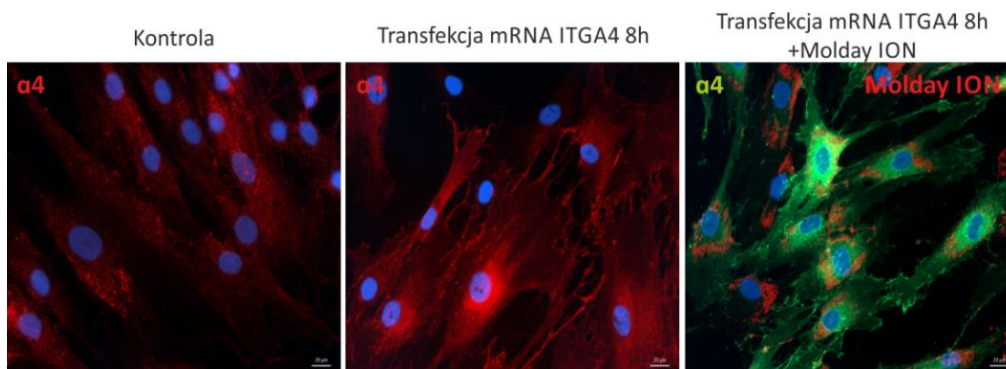


Ryc. 25. Analiza wpływu znakowania hBM-MSCs wybranymi znacznikami przyżyciowymi na proces chondrogenyzy. Schemat (A) przedstawia zaobserwowane stadia formowania się mikromasy w trakcie chondrogenyzy. Tabela (B) pokazuje zestawienie etapów formowania mikromasy w kolejnych dniach różnicowania w grupach znakowanych i kontrolnych hBM-MSC. (C) hBM-MSCs wybarwione przyżyciowymi znacznikami: Molday ION, CMFDA lub transfekowane mRNA eGFP oraz hBM-MSCs natywne nieznakowane hodowane *in vitro* w pożywce stymulującej chondrogenezę w 3-cim, 6-tym, 9-tym i 11-stym i 15-stym dniu różnicowania, obraz z mikroskopu fluorescencyjnego(a) i świetlnego po barwieniu błękitem alcańskim (b,c), skala 100 μm , powiększenie x10 (a,b); x 1,5 (c).

Stadium „A” to komórki rosnące w postaci płaskich kolonii o kształcie zbliżonym do kulistego i bardzo dużym zagęszczeniu komórek w części przyśrodkowej kolonii. Podczas stadium „B” dochodziło do obkurczania i pofałdowania jednego z boków kolonii oraz formowania struktury zbliżonej kształtem do trójkąta. W stadium „C” kolonie komórek przybierały formę trójwymiarową, kulistą. Podczas pierwszych trzech dni procesu różnicowania tylko hBM-MSCs wyznakowane Molday ION osiągały stadium „C”. W tym czasie komórki kontrolne obserwowano w stadium „A” lub „B” natomiast hBM-MSCs znakowane CMFDA lub transfekowane mRNA eGFP w trzecim dniu hodowli osiągały stadium „A”. W szóstym dniu eksperymentu hBM-MSCs kontrolne lub znakowane Molday ION tworzyły kuliste struktury (stadium „C”) zaś kolonie hBM-MSCs transfekowanych mRNA eGFP osiągały stadium „B” podobnie jak kolonie komórek znakowanych CMFDA, wśród których pojawiały się także kolonie w stadium „C”. W dziewiątym dniu procesu różnicowania hBM-MSCs barwionych trzema różnymi znacznikami kolonie komórek pochodzących ze wszystkich populacji osiągały stadium „C”, które było widoczne do końca prowadzonych obserwacji w dniu piętnastym (ryc. 25B). Sygnał fluorescencji wyznakowanych hBM-MSCs był widoczny w komórkach w których do wyznakowania użyto zarówno Molday ION jak i CMFDA oraz eGFP. Zastosowanie w tym eksperymencie błękitu alcańskiego pozwoliło

na identyfikację w różnicujących się hBM-MSCs proteoglikanów, typowych dla chondrocytów. Co ciekawe obecność proteoglikanów obserwowano w komórkach kontrolnych i hBM-MSCs barwionych CMFDA czy transfekowanych mRNA eGFP natomiast nie wykazano ich w hBM-MSCs znakowanych Molday ION. Komórki te nie barwiły się na niebiesko, co może sugerować, iż hBM-MSCs po znakowaniu Molday ION nie są w stanie przejść ostatecznego etapu różnicowania w dojrzałe chondrocyty, ale może to być również błąd odczytu związany z obecnością w komórkach nanocząstek żelaza, które przesłaniają niebieski kolor błękitu alcjańskiego (ryc. 25C).

Podsumowując I etap moich badań, z wykorzystanych do przyżyciowego znakowania hBM-MSCs trzech różnych barwników fluorescencyjnych najbardziej użyteczny okazał się Molday ION zawierający nanocząstki tlenku żelaza i rodaminę B. Znacznik ten długo utrzymywał się w komórkach hBM-MSCs podczas ich hodowli *in vitro*. hBM-MSCs wyznakowane Molday ION zachowywały prawidłowe cechy morfologiczne i fenotypowe, prezentowały porównywalny z komórkami natywnymi poziom aktywności metabolicznej jak i ekspresji większości czynników wzrostu oraz zdolność do różnicowania w kierunku adipocytów i osteoblastów. Na podstawie powyższych wyników badań hBM-MSCs znakowane Molday ION zostały wybrane do dalszych moich eksperymentów wykonywanych zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Rodamina B, która wykazuje silne właściwości fluorescencyjne pozwala na identyfikację znakowanych komórek zarówno w hodowli *in vitro* jak i po przeszczepie w tkance *post mortem*. Właściwości ferromagnetyczne, jakie posiadają nanocząstki żelaza będące składową częścią znacznika Molday ION umożliwiają natomiast wizualizację wyznakowanych hBM-MSCs w czasie rzeczywistym podczas infuzji komórek, a także w sekwencji czasowej po ich transplantacji u żywych zwierząt z użyciem MRI.



Ryc. 26. Analiza immunocytochemiczna obecności białka $\alpha 4$ w hBM-MSCs natywnych (kontrola) i transfekowanych mRNA ITGA4 lub hBM-MSCs znakowanych Molday ION a następnie transfekowanych mRNA ITGA4. Skala 20 μm , powiększenie x20.

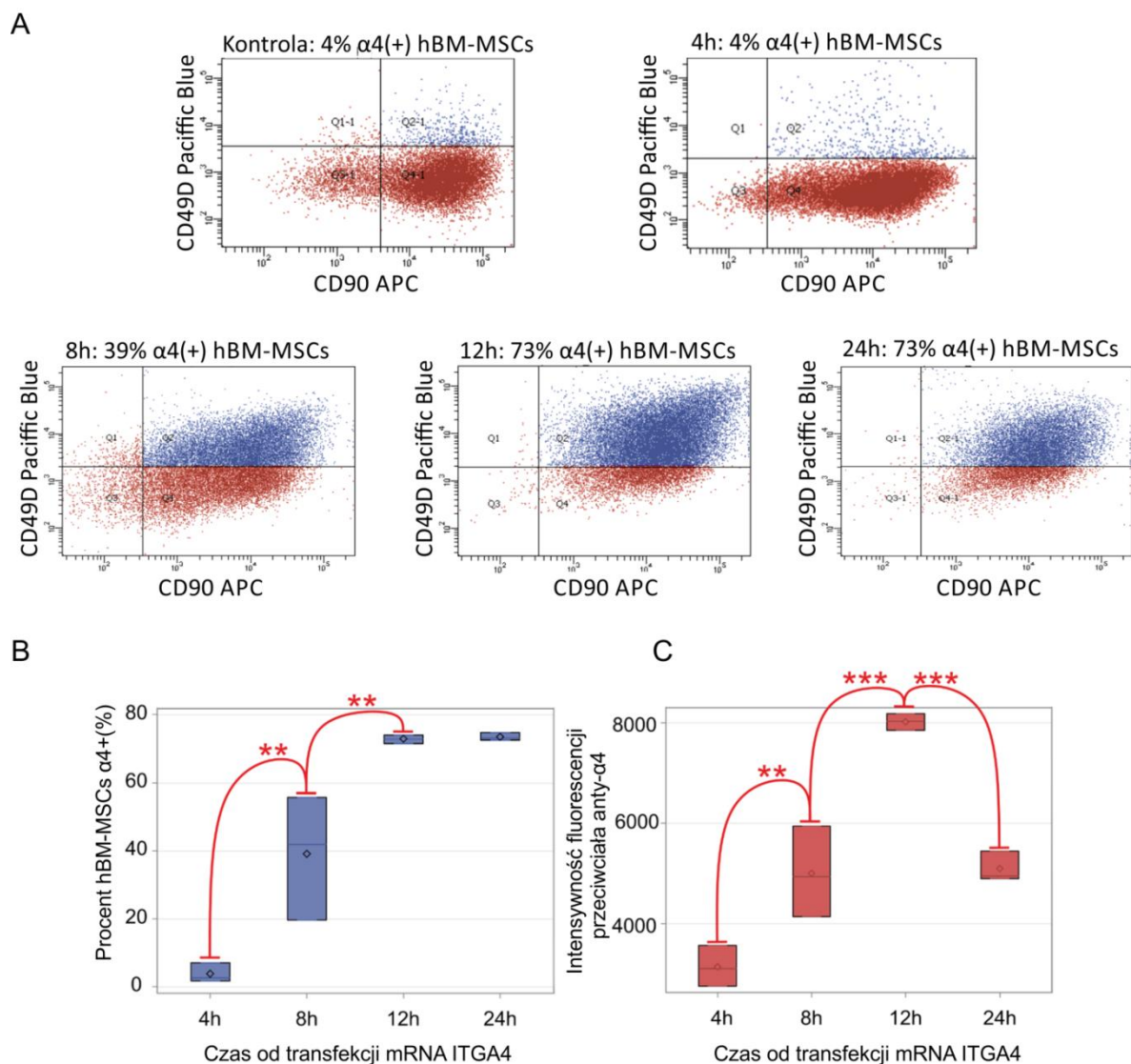
II etap moich badań miał na celu porównanie właściwości biologicznych hBM-MSCs natywnych i wykazujących nad-ekspresję receptora uczestniczącego w adhezji i transmigracji komórek - integryny VLA-4 w warunkach *in vitro*. hBM-MSCs z nad-ekspresją VLA-4 zostały otrzymane w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej metodą modyfikacji genetycznej z udziałem mRNA ITGA4. Transfekcja wymienionym konstruktem powoduje, że w komórkach obecne jest mRNA kodujące podjednostkę $\alpha 4$ integryny VLA-4, która nie występuje w natywnych hBM-MSCs. W zmodyfikowanych komórkach, 8 godzin po transfekcji pojawia się białko $\alpha 4$ widoczne w błonie komórkowej (ryc. 26) (Nowakowski i in.,

2017). Celem szczegółowym tych badań było dokonanie oceny funkcjonalnej zmodyfikowanych komórek w tym porównania kinetyki ich poruszania, zatrzymywania się, przylegania i migracji w warunkach *in vitro* w odniesieniu do natywnych hBM-MSCs.

5.2. Analiza właściwości adhezyjnych hBM-MSCs wykazujących nad-ekspresję integryny $\alpha 4$

5.2.1. Ocena profilu ekspresji białka $\alpha 4$ po transfekcji hBM-MSCs przy użyciu mRNA ITGA4

Wybór hBM-MSCs, które po modyfikacji mRNA ITGA4 były używane do dalszych badań został poprzedzony oceną profilu ekspresji białka $\alpha 4$ na powierzchni komórek w sekwencji czasowej od momentu transfekcji. Analiza natywnych hBM-MSCs przeprowadzona przy użyciu cytometrii przepływowej wykazała, iż 4 % komórek cechuje się endogenną ekspresją białka $\alpha 4$. Po dokonaniu transfekcji mRNA ITGA4 odsetek hBM-MSCs wykazujących ekspresję białka $\alpha 4$ był w pierwszych czterech godzinach porównywalny z poziomem wykrywanym u populacji kontrolnej. Osiem godzin od transfekcji hBM-MSCs liczba komórek $\alpha 4$ pozytywnych wzrastała do 39 % i osiągała maksymalny poziom 73 % po 12 godzinach. Ten wysoki odsetek hBM-MSCs wykazujących ekspresję białka $\alpha 4$ utrzymywał się 24 godziny od momentu transfekcji (ryc. 27A). Jednocześnie od momentu przeprowadzania transfekcji wzrastała intensywność sygnału fluorescencyjnego generowanego przez przyłączone do komórek cząsteczki przeciwciała specyficznego dla antygenów $\alpha 4$, co pośrednio świadczy o większej gęstości tego białka w błonie komórkowej transfekowanych hBM-MSCs. Obserwowano stopniowy wzrost sygnału, który osiągał swoją najwyższą wartość 12 godzin po transfekcji a następnie obniżał się, co sugeruje zmniejszenie poziomu syntezy białka $\alpha 4$ w transfekowanych mRNA ITGA4 hBM-MSCs (ryc. 27 B-C). Biorąc pod uwagę powyższe wyniki badań, w moich dalszych eksperymentach używałam hBM-MSCs charakteryzujące się najwyższym poziomem ekspresji białka $\alpha 4$ czyli w okresie 8-12 godzin od wprowadzenia mRNA ITGA4 do komórek. Istotą badań *in vitro* była ocena ruchu i przylegania zmodyfikowanych przez transfekcję mRNA ITGA4 komórek hBM-MSCs poprzez zastosowanie zaadaptowanej do naszych celów techniki mikroprzepływów. Do badań służyły komory przepływowe (microfluidic device) będące układem bardzo precyzyjnych mikrokanatów, które stanowią model kapilar naczyniowych, a obserwowany w nich laminarny przepływ imituje warunki panujące w naczyniach krwionośnych. W naszych doświadczeniach hBM-MSCs podawane do otworu wpustowego przemieszczały się przez kanał komory przepływowej. Ruch komórek był indukowany działaniem pompy infuzyjnej. Przezroczystość kamery pozwalała na obserwację zachowania przepływających komórek oraz ilościową ocenę ich przylegania. Przeprowadzane eksperymenty były nagrywane kamerą połączoną z mikroskopem konfokalnym, a pochodzące z nich filmy analizowano manualnie bądź przy użyciu specjalnego programu CellFlowTracker.

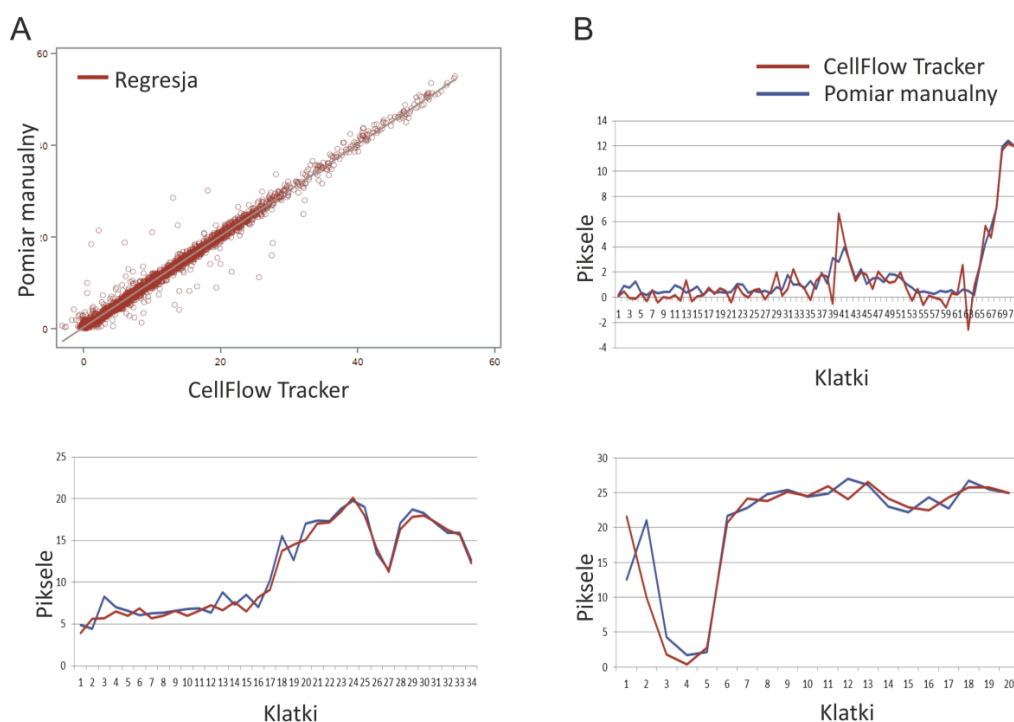


Ryc. 27 Analiza cytometryczna obecności białka $\alpha 4$ na powierzchni hBM-MSCs po transfekcji mRNA ITGA4. Wykresy rozproszenia (A) pokazują rozdział populacji hBM-MSCs na subpopulacje komórek CD90⁺ (czerwone) z wyodrębnieniem wśród nich komórek $\alpha 4+$ (fioletowe) po 4, 8, 12 i 24 godzinach od transfekcji mRNA ITGA4. Wykres B pokazuje zmianę procentowego udziału komórek $\alpha 4+$ w obrębie populacji hBM-MSCs (CD90⁺) natomiast wykres C przedstawia zmianę intensywności siły sygnału fluorescencyjnego generowanego przez przeciwciała anti- $\alpha 4$ przyłączone do analizowanych komórek w kolejnych punktach czasowych (4, 8, 12 i 24 godziny) od wprowadzenia mRNA ITGA4 do komórek. Do określenia istotności statystycznej użyto testu typu III efektów stałych, a do porównania metody LMS. Wykresy pudełkowe prezentują rozproszenie i kształt rozkładu danych dla wartości badanej w porównywanych populacjach. Długość przedstawionych słupków jest równa rozstępowi ćwiartkowemu (Q1-Q3) danych, linia wewnątrz słupka wyznacza medianę, natomiast koło średnią arytmetyczną, wartości odstające są przedstawione w postaci okręgów. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *, *** $p < 0.001$ (n=3)

5.2.2. Walidacja programu CellFlow Tracker

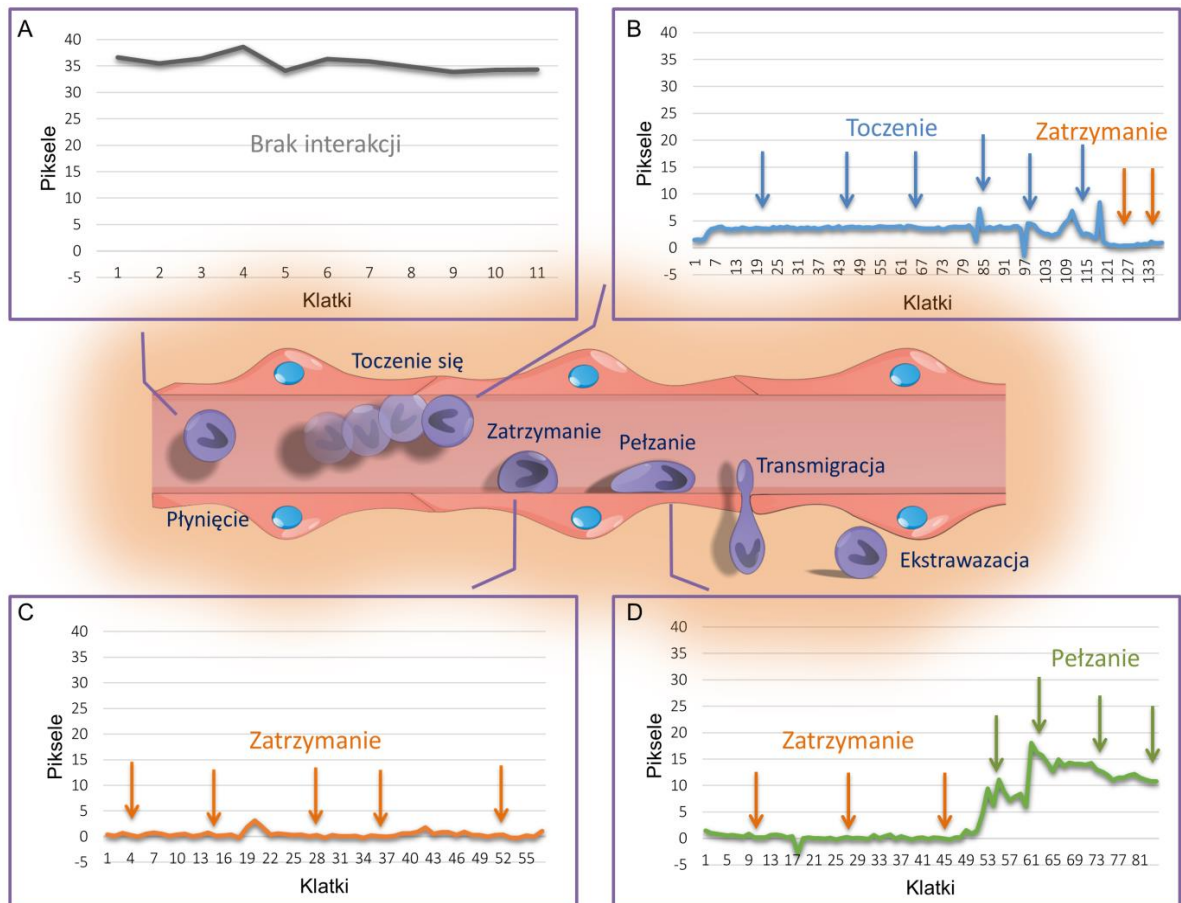
W celu przeprowadzenia wielkoskalowej analizy kinetyki przepływu zmodyfikowanych mRNA ITGA4 hBM-MSCs, na nasze specjalne zlecenie napisany został program komputerowy oceniający ruch komórek w komorach przepływowych. W celu określenia poprawności jego działania wykonano porównanie ręcznych i automatycznych pomiarów odległości przebytej przez hBM-MSCs podczas przepływu przez kanał komory mikroprzepływowej między kolejnymi klatkami nagrania (ryc.28A). Pomiary te charakteryzowały się bardzo wysoką korelacją ($r=0.99$, $p<0.001$). Druga analiza obejmowała

hierarchiczny model wielopoziomowy z trzema hierarchicznie rozmieszczonymi zmiennymi losowymi takimi jak: 1) nagranie; 2) pojedyncze komórki w każdym filmie; 3) pomiary poszczególnych odległości, jakie każda komórka przebyła między ramkami. Porównanie to nie wykazało różnicy między manualną a automatyczną metodą pomiaru ($df=7004$, $F=1.75$, $p < 0.19$). Przeprowadzono również analizę typu regresji wieloczynnikowej ze zmiennymi obejmującymi: wideo, pomiary wykonane dla poszczególnych komórek i metodę analizy (ręcznie lub automatycznie) ($df=6801$). Zgodnie z oczekiwaniami obserwowano różnice między filmami obrazującymi przepływ komórek kontrolnych a nagraniami z przepływem hBM-MSCs transfekowanych mRNA ITGA4 ($F=238.22$, $p < 0.001$), jak również różnice w pomiarach wykonanych dla poszczególnych komórek na danym nagraniu ($F=56.42$, $p < 0.001$) oraz pomiędzy pomiarami odległości, jakie dana komórka pokonała pomiędzy kolejnymi klatkami nagrania ($F=5.16$, $p < 0.001$), ale nie stwierdzono różnic między wartościami dla określonej metody pomiaru (pomiar wykonany ręcznie vs automatycznie, $F=2.43$, $p=0.11$). Zastosowanie trzech metod statystycznych dostarczyło mocnych dowodów dla potwierdzenia poprawności działania programu CellFlow Tracker. Wynik ten obrazują również silnie pokrywające się wykresy zmian prędkości dla danej komórki uzyskane na podstawie pomiarów ręcznych i danych wygenerowanych automatycznie przez program CellFlow Tracker (ryc. 28B). Udana walidacja dokładności pomiarów dokonywanych przez program CellFlow Tracker pozwoliła na wykonanie automatycznej analizy interakcji hBM-MSCs z białkiem VCAM1 w trakcie przepływu przez kanał komory mikroprzepływowej.



Ryc. 28. Normalizacja pomiarów odległości pokonywanych przez przepływające przez kanał komory przepływowej hBM-MSCs wykonywanych przez program CellFlow Tracker względem pomiarów manualnych. (A) Wykres pokazuje korelację wyników uzyskanych obydwiema metodami. Korelację określano przy użyciu współczynnika r Pearson'a wbudowanego w PROC CORR (SAS 9.4). (B) Wykresy zmian prędkości ruchu dla wybranych hBM-MSCs przepływających przez kanał komory przepływowej pokryty białkiem VCAM1 wygenerowane na podstawie danych podawanych przez program CellFlow Tracker (linia czerwona) i uzyskanych poprzez pomiar manualny (linia fioletowa).

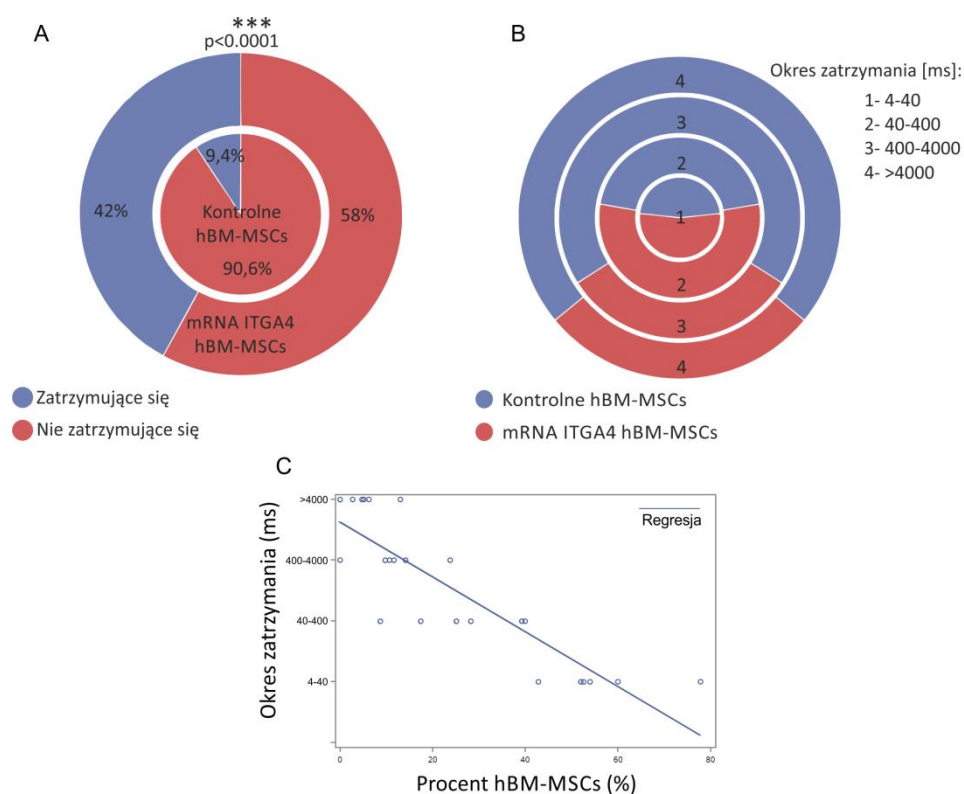
5.2.3. Ocena kinetyki ruchu hBM-MSCs natywnych i komórek transfekowanych mRNA ITGA4 przy pomocy techniki mikroprzepływów



Ryc. 29. Schemat przedstawiający wykresy wygenerowane przez program CellFlow Tracker dla czterech podstawowych wzorców zmian prędkości ruchu obserwowanych u hBM-MSCs przepływających przez kanał komory przepływowej pokrytej VCAM1 w odniesieniu do etapów wyróżnianych podczas diapedezy leukocytów takich jak (A) płynięcie, (B) toczenie się, (C) zatrzymanie i (D) pełzanie.

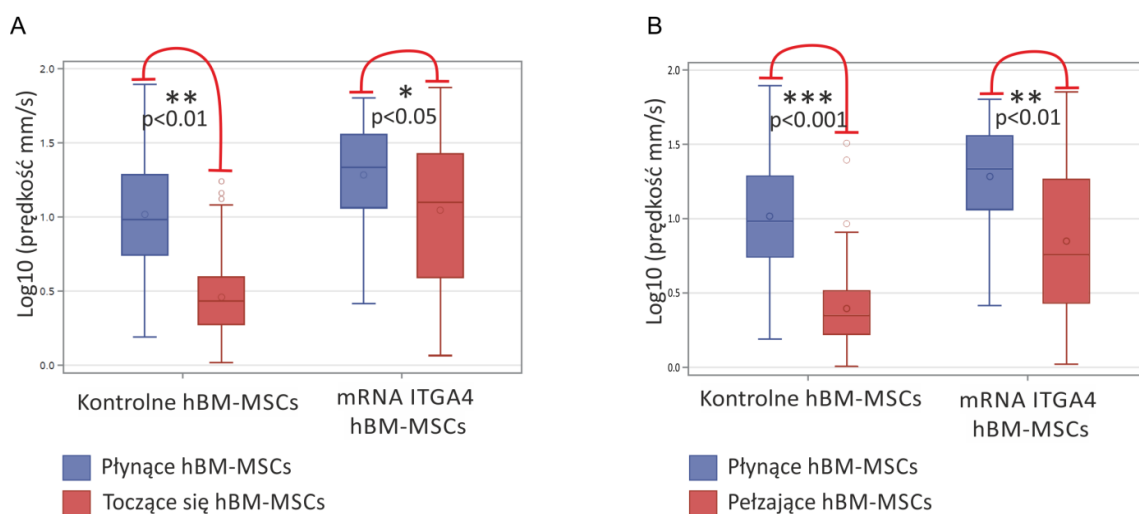
Badając *in vitro* przepływ hBM-MSCs przez kanał komory mikroprzepływowej (microfluidic device) obserwowaliśmy różne fazy ruchu komórek przemieszczających się w kanale, które były analogiczne z tymi, jakie występują podczas procesu diapedezy leukocytów w naczyniu krwionośnym. Kinetyka ruchu hBM-MSCs obejmowała: płynięcie, toczenie się, zatrzymywanie i pełzanie komórek (ryc.29).

W naszych badaniach zarówno hBM-MSCs natywne jak i te z nad-ekspresją cząsteczek VLA-4 były zdolne do wiązania się z powierzchnią kanału komory pokrytej VCAM1 jednak procent komórek zatrzymujących się był znacznie wyższy w przypadku komórek transfekowanych mRNA ITGA4 niż hBM-MSCs natywnych (42.01 vs 9.41 % $p < 0.001$) (ryc. 30A). Nie stwierdzono znamiennej istotnych różnic w długości czasu zatrzymywania się komórek badanych dwóch populacji (ryc. 30B) natomiast czas zatrzymania hBM-MSCs był odwrotnie proporcjonalny do liczby komórek, które się zatrzymały ($r = 0.87$ $p < 0.001$) (ryc. 30C).



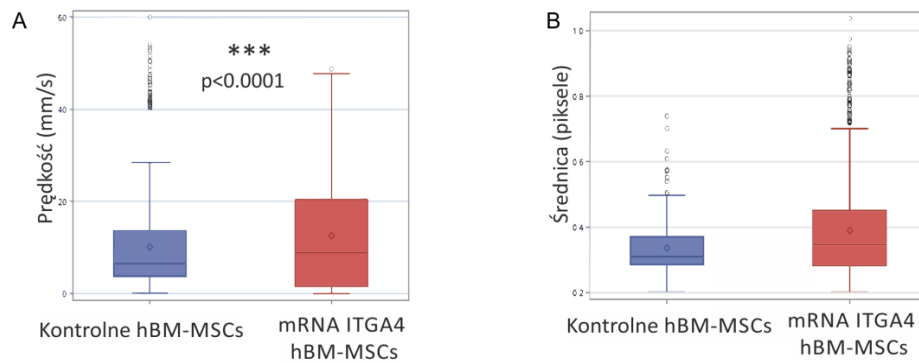
Ryc. 30. Analiza procesu zatrzymania się hBM-MSCs transfekowanych mRNA ITGA4 i komórek kontrolnych przepływających przez kanał komory przepływowej pokrytej białkiem VCAM1. Wykres A przedstawia procentowy udział komórek podlegających zatrzymaniu w grupie hBM-MSCs transfekowanych mRNA ITGA4 i kontrolnych. Wykres B przedstawia podział komórek zatrzymujących się w grupie komórek transfekowanych mRNA ITGA4 i kontrolnych na podgrupy hBM-MSCs, które pozostawały w bezruchu przez dany okres czasu. Wykres C przedstawia korelację pomiędzy liczbą wszystkich komórek zatrzymujących się a okresem czasu ich zatrzymania. Do określenia istotności statystycznej użyto testu typu III efektów stałych, a do porównania metody LMS. Wartości względne (procentowe) są przedstawione, jako wykresy kołowe. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. (n=3)

Zatrzymanie hBM-MSCs było poprzedzone spowolnieniem prędkości ich przepływu przez kanał komory w porównaniu z szybkością ruchu tych komórek, które płynęły w kanale nie zatrzymując się. Różnice prędkości komórek toczących się w stosunku do szybkości hBM-MSCs płynących w kanale komory bez zatrzymania były znamienne statystycznie w obu populacjach komórek zarówno hBM-MSCs transfekowanych mRNA ITGA (p<0.05) jak hBM-MSCs natywnych (p<0.01) (ryc.31A). Potwierdziło to występowanie etapu toczenia się komórek poprzedzającego zatrzymanie podczas przepływu zarówno hBM-MSCs natywnych jak i modyfikowanych. Po etapie zatrzymania część komórek ponownie przechodziła do fazy ruchu, którego średnia prędkość była niższa w porównaniu do szybkości ruchu komórek przepływających przez kanał komory przepływowej bez zatrzymania. Tę różnicę w szybkości ruchu pełzających komórek w stosunku do tych, które płynęły bez zatrzymania w kanale komory były istotnie znamienne zarówno w obrębie populacji hBM-MSCs transfekowanych mRNA ITGA4 (p<0.01) jak i komórek kontrolnych niemodyfikowanych genetycznie (p<0.001) (ryc.31B).



Ryc. 31. Analiza procesu toczenia się i pełzania hBM-MSCs transfekowanych mRNA ITGA4 i komórek kontrolnych przepływających przez kanał komory przepływowej pokrytej białkiem VCAM1. Wykres A przedstawia rozkład średniej prędkości ruchu komórek przepływających przez kanał komory przepływowej nie zatrzymując się (słupki fioletowe) oraz rozkład średniej prędkości ruchu komórek przepływających przez kanał komory przepływowej w okresie przed zatrzymaniem – w trakcie potencjalnie występującego etapu toczenia się komórek (słupki czerwone) w obrębie grupy komórek kontrolnych i transfekowanych mRNA ITGA4. Wykres B przedstawia rozkład średniej prędkości ruchu komórek przepływających przez kanał komory przepływowej w okresie po ich zatrzymaniu – w trakcie potencjalnie występującego etapu pełzania komórek (słupki fioletowe) oraz rozkład średniej prędkości ruchu komórek przepływających przez kanał komory przepływowej nie zatrzymując się (słupki czerwone) w obrębie grupy komórek kontrolnych i transfekowanych mRNA ITGA4. Do określenia istotności statystycznej użyto testu typu III efektów stałych, a do porównania metody LMS. Wykresy pudełkowe prezentują rozproszenie i kształt rozkładu danych dla wartości badanej w porównywanych populacjach. Długość przedstawionych słupków jest równa rozstępowi ćwiartkowemu (Q1-Q3) danych, końcówki wąsów wskazują wartości minimalną i maksymalną, linia wewnątrz słupka wyznacza medianę, natomiast kwadrat średnią arytmetyczną, wartości odstające są przedstawione w postaci okręgów. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. (n=3)

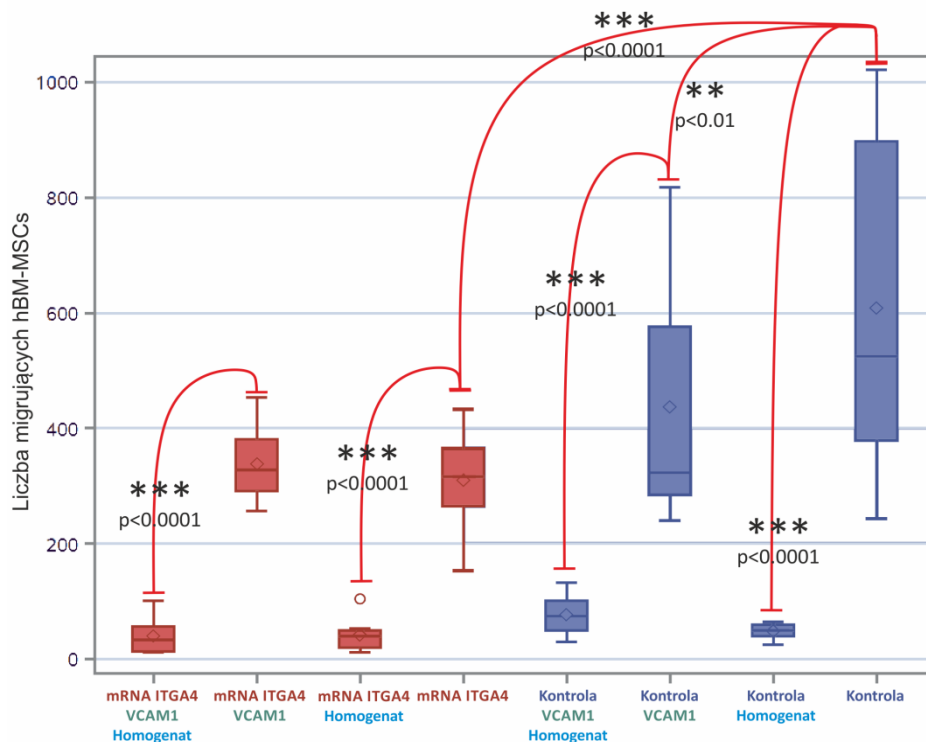
Analizując wszystkie fazy ruchu komórek przepływających przez kanał komory okazało się, że hBM-MSCs z nad-ekspresją integrzyn VLA4 wykazują większą średnią prędkość przepływu, toczenia się i pełzania w porównaniu z komórkami natywnymi (ryc. 32A). Nie stwierdzono różnicy w średnicy komórek pomiędzy badanymi populacjami hBM-MSCs (ryc. 32B), co wyklucza wpływ rozmiarów badanych obiektów, jako potencjalnego czynnika wpływającego na szybkość ich przepływu.



Ryc. 32. Analiza prędkości przepływu hBM-MSCs transfekowanych mRNA ITGA4 i komórek kontrolnych przepływających przez kanał komory przepływowej pokrytej białkiem VCAM1. Wykres A przedstawia rozkład średniej prędkości ruchu komórek kontrolnych (słupki fioletowy) i transfekowanych mRNA ITGA4 (słupki czerwony). Wykres B przedstawia rozkład średnicy komórek kontrolnych (słupki fioletowy) i transfekowanych mRNA ITGA4 (słupki czerwony). Do określenia istotności statystycznej użyto testu typu III efektów stałych, a do porównania metody LMS. Wartości względne (procentowe) są przedstawione, jako wykresy kołowe. Korelacje określano przy użyciu współczynnika r Pearson'a wbudowanego w PROC CORR (SAS 9.4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ($n=3$).

5.2.4. Analiza zdolności migracyjnych natywnych oraz transfekowanych mRNA ITGA4 komórek hBM-MSCs *in vitro* w komorach migracyjnych typu transwell

Do oceny zdolności migracji hBM-MSCs *in vitro* i porównania właściwości komórek natywnych i modyfikowanych w celu indukcji ekspresji białka $\alpha 4$ wykorzystane zostały dwukomorowe szalki hodowlane typu transwell. Wyniki badań wykazały, że umieszczone w górnej części komory hBM-MSCs transfekowane mRNA ITGA4 mniej efektywnie przechodzą przez błonę zatrzymując się na jej powierzchni w porównaniu z komórkami natywnymi, których większa liczba migrowała na spodnią powierzchnię błony ($p < 0.0001$). W przypadku gdy błona oddzielająca dwie części komory została pokryta białkiem VCAM1, liczba migrujących komórek natywnych zniżyła się ($p < 0.01$) podczas gdy obecność VCAM1 nie miała żadnego wpływu na liczbę przechodzących przez błonę hBM-MSCs wykazujących nad-ekspresję cząsteczek VLA-4. Co ciekawe, dodatek do dolnej części komory migracyjnej homogenatu mózgu szczura po uszkodzeniu ouabainą zahamował przechodzenie hBM-MSCs przez błonę zarówno w przypadku komórek natywnych jak i transfekowanych mRNA ITGA4. Znamienne istotne różnice statystyczne odnotowano w obu populacjach hBM-MSCs ($p < 0.0001$) (ryc. 33). Liczba migrujących komórek w komorach w obecności homogenatu uszkodzonego ouabainą mózgu szczura była bardzo niska i porównywalna w przypadku hBM-MSCs natywnych i modyfikowanych. Pokrycie błony półprzepuszczalnej białkiem VCAM1, gdy w dolnej komorze znajdował się homogenat z uszkodzonego mózgu szczura nie miało wpływu na powyższy wynik.



Ryc. 33. Analiza zdolności do migracji transfekowanych mRNA ITGA4 (mRNA ITGA4) i kontrolnych (Kontrola) hBM-MSCs w szalkach migracyjnych typu transwell pokrytych/ lub nie białkiem VCAM1 (VCAM1) oraz w obecności/bądź przy braku czynnika chemotaktycznego (homogenat). Słupki przedstawiają rozkład ilości transfekowanych mRNA ITGA4 oraz kontrolnych hBM-MSCs, które migrowały na drugą stronę błony porowatej. Do określenia istotności statystycznej użyto testu typu III efektów stałych, a do porównania metody LMS. Wykresy pudełkowe prezentują rozproszenie i kształt rozkładu danych dla wartości badanej w porównywanych populacjach. Długość przedstawionych słupków jest równa rozstępowi ćwiartkowemu (Q1-Q3) danych, końcówki wąsów wskazują wartości minimalną i maksymalną, linia wewnątrz słupka wyznacza medianę, natomiast kwadrat średnią arytmetyczną, wartości odstające są przedstawione w postaci okręgów. *p <0.05, **p <0.01, ***p <0.001 (n=6).

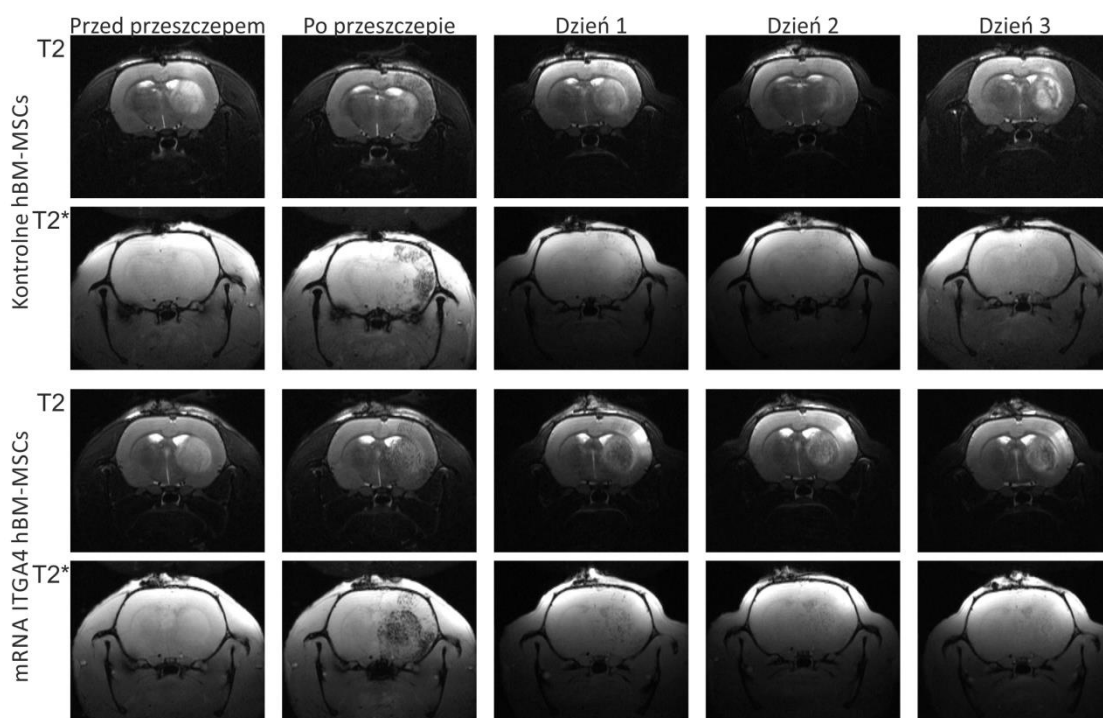
Podsumowując II etap moich badań okazało się, że hBM-MSCs modyfikowane przez wprowadzenie mRNA ITGA4 charakteryzują się najwyższym poziomem ekspresji białka $\alpha 4$ w czasie 8-12 godzin po transfekcji. Modyfikacja ta zapewnia wzrost aktywności adhezyjnych komórek, zwiększając liczbę hBM-MSCs, które zatrzymują się podczas przepływu przez komorę (microfluidic device) pokrytą białkiem VCAM1, stanowiącą model *in vitro* naczynia krwionośnego. Jednocześnie wzrost zdolności do przylegania komórek transfekowanych mRNA ITGA4 powoduje ich silniejsze wiązanie z błoną komory transwell i ogranicza zdolność do migracji. Ponadto dzięki zastosowaniu wielkoskalowej zautomatyzowanej analizy danych generowanych przez dedykowany do naszych doświadczeń program CellFlowTracker wykazano, że podczas przepływu komórek przez kanał komory zarówno natywne jak i modyfikowane mRNA ITGA4 hBM-MSCs podlegają procesom toczenia i pełzania, analogicznym do etapów obserwowanych w populacji leukocytów w łożysku naczyniowym podczas ich diapedezy.

Powyższe informacje stały się inspiracją do przeprowadzenia **III etapu moich badań**, które miały za zadanie ocenę funkcjonalną *in vivo* hBM-MSCs transfekowanych mRNA ITGA4, a w szczególności zdolności zasiedlania przez nie mózgu po przeszczepie dotętniczym u szczurów w eksperymentalnym modelu uszkodzenia prądkowia ouabainą.

5.3. Ocena hBM-MSCs przeszczepianych dotętniczo u biorców z uszkodzeniem mózgu

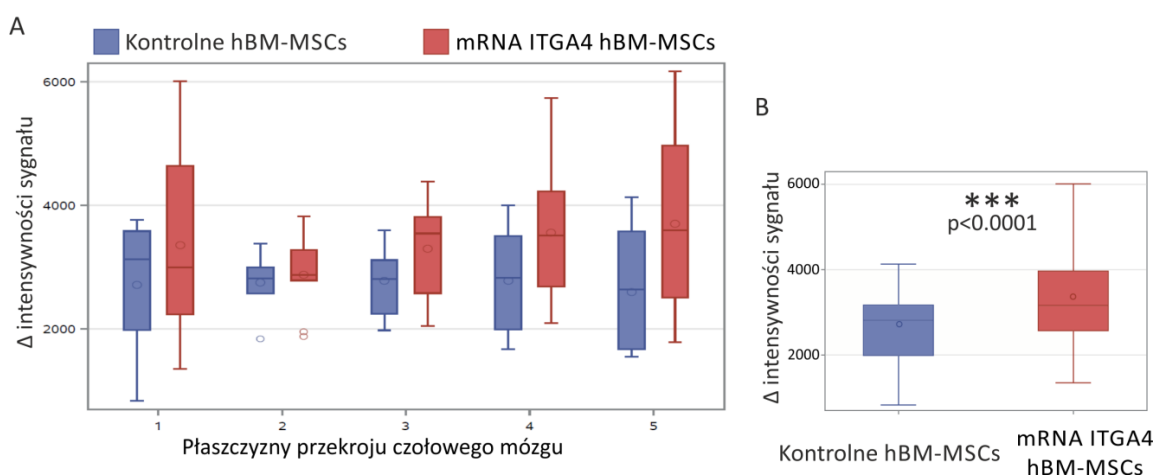
5.3.1. Analiza zasiedlania uszkodzonych obszarów mózgu przez systemowo podane hBM-MSCs

Komórki hBM-MSCs charakteryzujące się zwiększoną ekspresją podjednostki $\alpha 4$ integriny VLA-4 po dokonanej transfekcji mRNA ITGA4 lub komórki natywne niemodyfikowane genetycznie przeszczepiano dotętniczo, do tętnicy szyjnej wewnętrznej, szczurom po 48 godzinach od wykonania uszkodzenia mózgu ouabainą. Proces napływu komórek do uszkodzonej półkuli mózgu podczas ich transplantacji był monitorowany *in vivo* przy użyciu obrazowania w rezonansie magnetycznym. Przeszczepione dotętniczo transfekowane mRNA ITGA4 i kontrolne hBM-MSCs napływały do uszkodzonego obszaru mózgu i pozostawały w obrębie lub w pobliżu lezji (ryc. 34).



Ryc. 34. Ocena obecności przeszczepionych dotętniczo transfekowanych mRNA ITGA4 (mRNA ITGA4 hBM-MSCs) oraz kontrolnych (Kontrolne hBM-MSCs) hBM-MSCs w mózgu szczura z wywołanym podaniem ouabainy uszkodzeniem prążkowie. Transfekowane mRNA ITGA4 i kontrolne hBM-MSCs znakowane Molday ION widoczne na zdjęciach z rezonansu magnetycznego w obrazowaniu typu T2 i T2* przedstawiających stan bezpośrednio przed, po, dzień, dwa i trzy dni od przeszczepu.

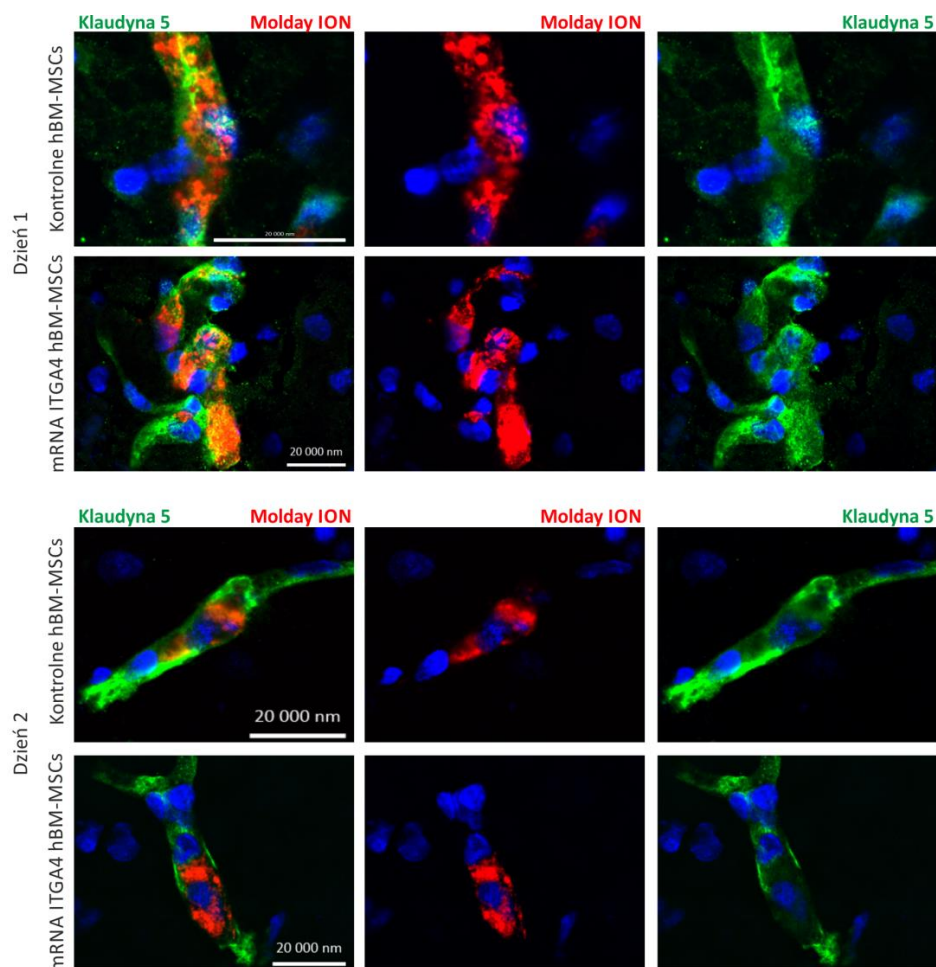
Bezpośrednio po transplantacji sygnał generowany przez obecne w znakowanych komórkach nanocząstek żelaza (Molday ION) był silniejszy w przypadku infuzji hBM-MSCs z nad-ekspresją VLA-4 w porównaniu z sygnałem pochodzącym z komórek niemodyfikowanych genetycznie. Zjawisko to było obserwowane dla większości analizowanych płaszczyzn przekroju (ryc. 35A), co pośrednio może świadczyć o większej liczbie komórek modyfikowanych mRNA ITGA4 niż hBM-MSCs kontrolnych w mózgu biorcy ($p < 0.0001$) (ryc. 35B). Obserwacja zmian poziomu sygnału pochodzącego przeszczepionych komórek znakowanych Molday ION w mózgu szczurów w sekwencji czasowej wykazała jego spadek po 24 godzinach od momentu transplantacji komórek i całkowity zanik po 3 dniach zarówno u zwierząt, którym podano hBM-MSCs transfekowane jak i u zwierząt, które otrzymały przeszczep komórek natiwnych. Próby wyjaśnienia lokalizacji przeszczepionych komórek w mózgu szczura przeprowadzono *post mortem* z zastosowaniem badań immunohistochemicznych.



Ryc. 35. Ocena pozostających w mózgu bezpośrednio po podaniu przeszczepionych dotętniczo transfekowanych mRNA ITGA4 (mRNA ITGA4 hBM-MSCs) oraz kontrolnych (Kontrolne hBM-MSCs) hBM-MSCs u szczurów z wywołanym podaniem ouabainy uszkodzeniem prążkowiec. Wykresy pokazują różnicę w intensywności sygnału pochodzącego od znakowanych Molday ION kontrolnych (słupki fioletowe) i transfekowanych mRNA ITGA4 (słupki czerwone) komórek hBM-MSCs bezpośrednio po przeszczepie w odniesieniu do stanu przed ich podaniem na poszczególnych płaszczyznach przekroju czołowego mózgu zwierząt (A) oraz sumarycznie dla wszystkich płaszczyzn przekroju (B). Do określenia istotności statystycznej użyto testu typu III efektów stałych, a do porównania metody LMS. Wykresy pudełkowe prezentują rozproszenie i kształt rozkładu danych dla wartości badanej w porównywanych populacjach. Długość przedstawionych słupków jest równa rozstępowi ćwiartkowemu (Q1-Q3) danych, końcówki wąsów wskazują wartości minimalną i maksymalną, linia wewnątrz słupka wyznacza medianę, natomiast koło średnią arytmetyczną, wartości odstające są przedstawione w postaci okręgów. *p < 0.05, **p < 0.01*, ***p < 0.001. (n=6)

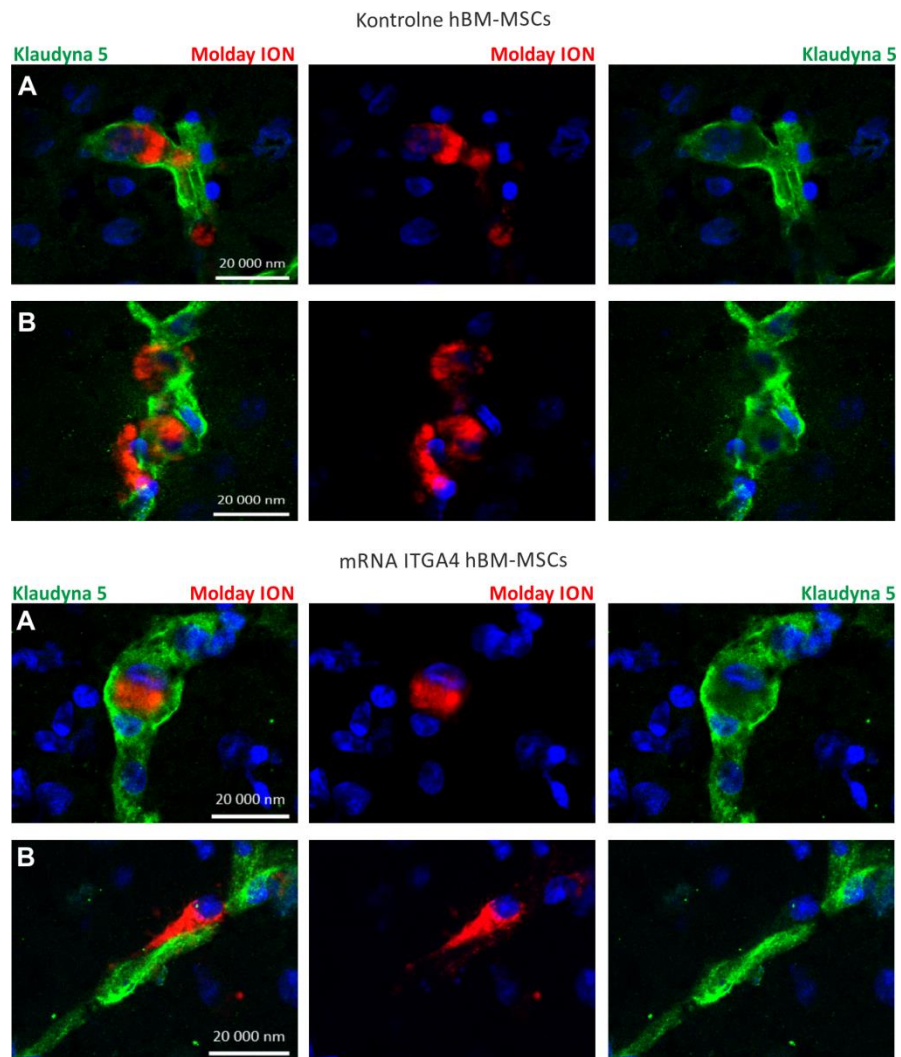
5.3.2. Ocena lokalizacji i zdolności do transmigracji hBM-MSCs kontrolnych lub wykazujących nad-ekspresję integryny $\alpha 4$ obecnych po przeszczepie w uszkodzonym mózgu

Badania immunohistochemiczne potwierdziły wyniki uzyskane w MRI. Po infuzji dotętniczej komórki znakowane Molday ION były widoczne w mózgu szczurów. Wyniki analizy, w których wykorzystano przeciwciało skierowane przeciwko Klaudynie 5, białku typowemu dla połączeń ścisłych komórek śródbłonna naczyń krwionośnych mózgu wykazały, że w ciągu pierwszych dwóch dni od transplantacji komórek zarówno hBM-MSCs modyfikowane mRNA ITGA4 jak i kontrolne znajdowały się wewnątrz światła naczyń krwionośnych mózgu (ryc. 36).



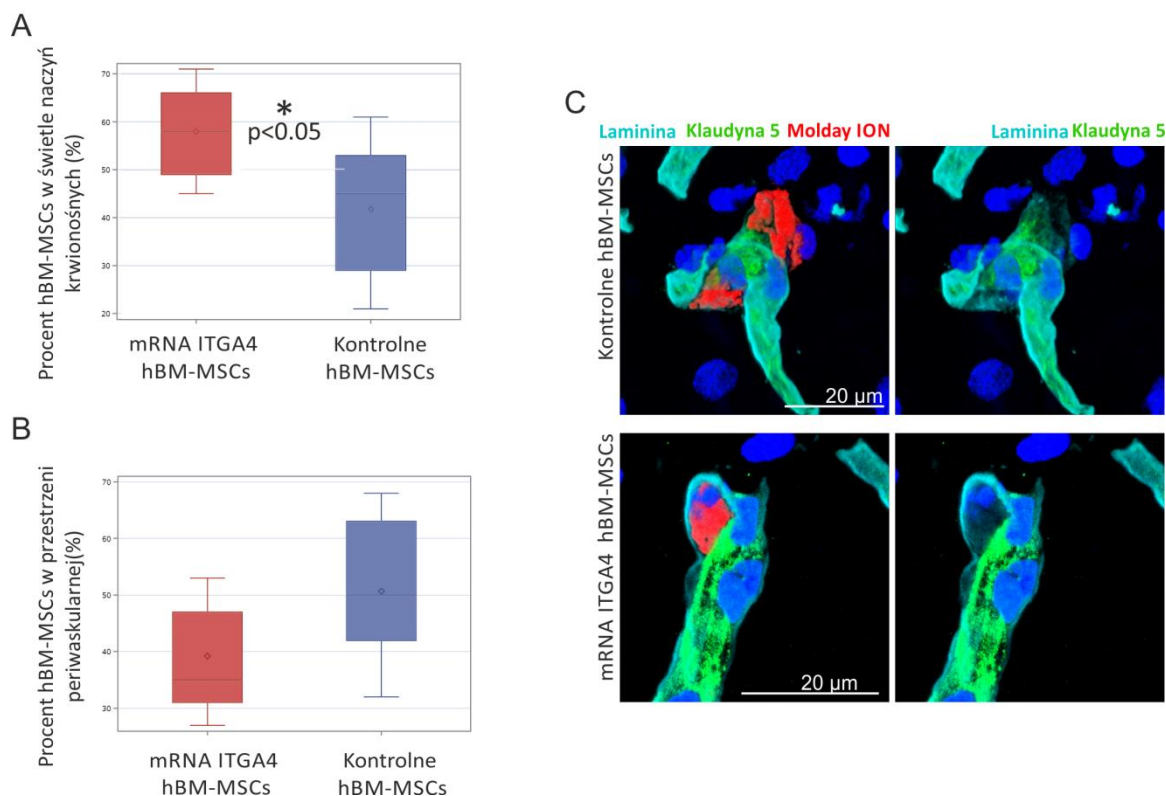
Ryc. 36. Analiza lokalizacji przeszczepionych hBM-MSCs względem naczyń krwionośnych w mózgu. Transfekowane mRNA ITGA4 (mRNA ITGA4 hBM-MSCs) i niemodyfikowane hBM-MSCs (Kontrolne hBM-MSCs) znakowane Molday ION (kolor czerwony) po transplantacji do mózgu szczura z wywołanym podaniem ouabainy uszkodzeniem prążkowiec. Obraz w mikroskopie konfokalnym po 24 i 48 godzinach od podania dotętniczego komórek. Naczynia krwionośne mózgu zostały uwidocznione przy użyciu przeciwciała skierowane przeciwko Klaudynie 5 (kolor zielony). Jądra komórek wyznakowano dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 20 μ m, powiększenie x40.

W trzecim dniu od przeszczepu część komórek obydwu populacji zarówno kontrolnych jak i modyfikowanych mRNA ITGA4 hBM-MSCs była obserwowana poza światłem naczyń krwionośnych, przylegając do komórek endotelialnych od strony parenchymy mózgu (ryc. 37).



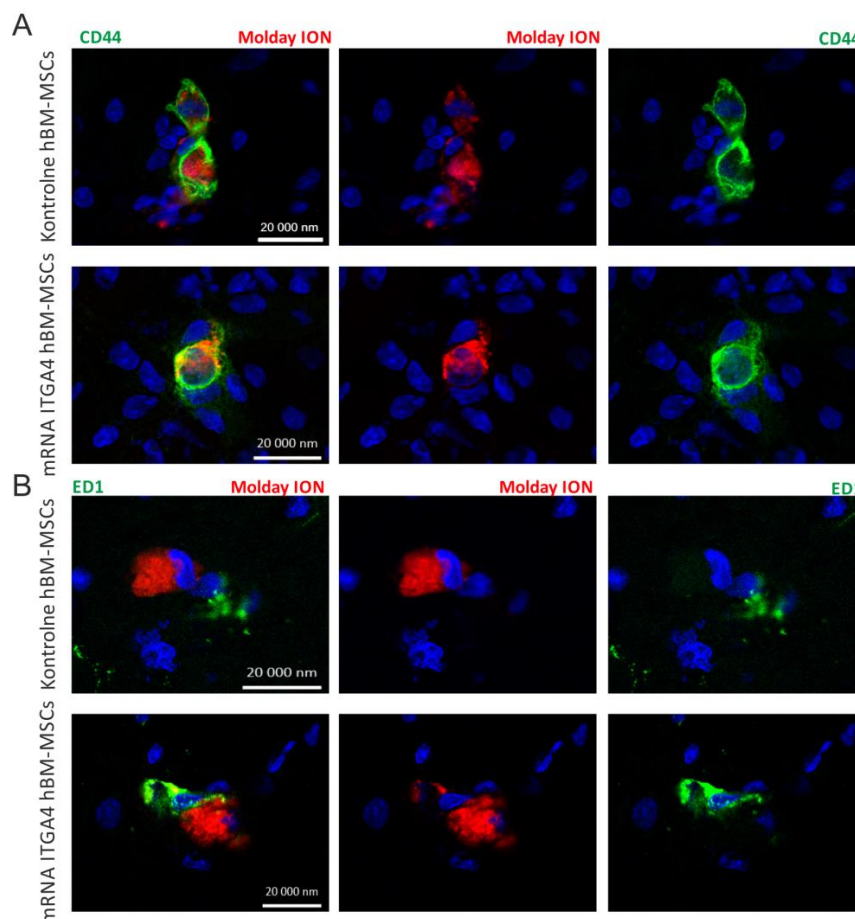
Ryc. 37. Analiza lokalizacji przeszczepionych hBM-MSCs względem naczyń krwionośnych. Transfekowane mRNA ITGA4 (mRNA ITGA4 hBM-MSCs) i natywne niemodyfikowane komórki hBM-MSC (Kontrolne hBM-MSCs) znakowane Molday ION (kolor czerwony) po transplantacji do mózgu szczura z wywołanym podaniem ouabainy uszkodzeniem prążkowiec. Przeszczepione komórki są widoczne zarówno wewnątrz światła naczynia krwionośnego (A) jak i poza warstwą komórek śródbłonna (B). Obraz w mikroskopie konfokalnym w 3-cim dniu od podania dotętniczego komórek. Naczynia krwionośne mózgu zostały uwidocznione przy użyciu przeciwciała skierowane przeciwko Klaudynie 5 (kolor zielony). Jądra komórek wyznakowano dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 20 μ m, powiększenie x40.

Analiza ilościowa wykazała, że w populacji wszystkich zidentyfikowanych w mózgu komórek dawcy więcej hBM-MSCs transfekowanych mRNA ITGA4 niż komórek kontrolnych hBM-MSCs pozostawało wewnątrz światła naczynia krwionośnego (52.5 ± 8.5 % vs 41 ± 6 %, $p < 0.05$) (ryc. 38A). Komórki, które przemieściły się poza światło naczyń krwionośnych mózgu znajdowały się w przestrzeni ograniczonej z jednej strony przez komórki śródbłonna, a z drugiej przez lamininę tworzącą błonę podstawną naczyń, w miejscu określanym mianem przestrzeni periwaskularnej. Różnice ilościowe pomiędzy procentem komórek z nad-ekspresją VLA-4 i komórek natywnych obserwowanych poza światłem naczyń (odpowiednio: 37 ± 8 % i 52 ± 4 %) nie były statystycznie istotne (ryc. 38B,C).



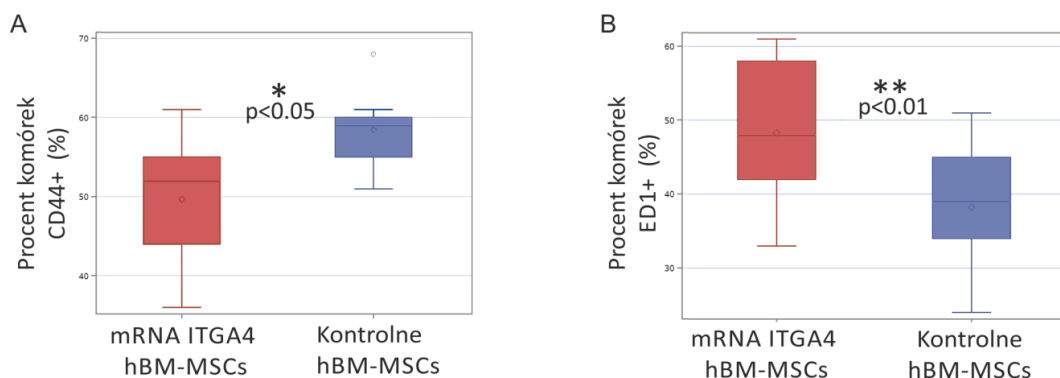
Ryc. 38. Analiza położenia przeszczepionych hBM-MSCs obecnych w mózgu szczura z wywołanym podaniem ouabainy uszkodzeniem prążkowiec w trzecim dniu od transplantacji względem naczyń krwionośnych. Wykresy przedstawiają procentowy udział komórek zlokalizowanych (A) wewnątrz światła naczyń krwionośnych oraz (B) w przestrzeni periwaskularnej w populacji wszystkich zidentyfikowanych hBM-MSCs obecnych w mózgu w obrębie grupy komórek transfekowanych mRNA ITGA4 (mRNA ITGA4 hBM-MSCs; słupki czerwone) i natywnych hBM-MSCs (Kontrolne hBM-MSCs; słupki fioletowe). Panel (C) przedstawia obraz widoczny w mikroskopie konfokalnym. Naczynia krwionośne mózgu zostały uwidocznione przy użyciu przeciwciała skierowane przeciwko Klaudynie 5 (kolor zielony) oraz Lamininie (kolor turkusowy). Jądra komórek wyznakowano dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 20 μm , powiększenie x40. Do określenia istotności statystycznej użyto testu typu III efektów stałych, a do porównania metody LMS. Wykresy pudełkowe prezentują rozproszenie i kształt rozkładu danych dla wartości badanej w porównywanych populacjach. Długość przedstawionych słupków jest równa rozstępowi ćwiartkowemu (Q1-Q3) danych, końcówki wąsów wskazują wartości minimalną i maksymalną, linia wewnątrz słupka wyznacza medianę, natomiast kwadrat średnią arytmetyczną, wartości odstające są przedstawione w postaci okręgów. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (n=6).

Ponadto, w mózгах biorców przeszczepu pobranych po 72 godzinach od transplantacji komórek została wykonana dodatkowa analiza immunohistochemiczna przy użyciu przeciwciała przeciw CD44, przeprowadzona w celu potwierdzenia tożsamości przeszczepionych hBM-MSCs. Aby wyodrębnić spośród populacji komórek dawcy pozostających w mózgu te, które zostały sfagocytowane przez komórki żerne (makrofagi/mikroglej), do identyfikacji aktywowanych komórek układu odpornościowego zastosowano przeciwciała wykrywające antygen ED1 (ryc. 39A,B).



Ryc. 39. Analiza fenotypu przeszczepionych hBM-MSCs obecnych w mózgu w trzecim dniu od transplantacji. Transfekowane mRNA ITGA4 (mRNA ITGA4 hBM-MSCs) i natywne niemodyfikowane komórki hBM-MSCs (Kontrolne hBM-MSCs) znakowane Molday ION (kolor czerwony) po transplantacji do mózgu szczura z wywołanym podaniem ouabainy uszkodzeniem prążkowiec. Obraz w mikroskopie konfokalnym uzyskany po użyciu przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom (A) CD44 (kolor zielony) oraz (B) ED1 (kolor zielony). Jądra komórek wyznakowano dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 20 μ m, powiększenie x40.

Badania z użyciem przeciwciała skierowanego przeciwko białku CD44 wraz z nakładającym się sygnałem od znacznika Molday użytego do wyznakowania hBM-MSCs przed podaniem dotętnicznym potwierdziły, że 49.5 ± 1.5 % komórek z nad-ekspresją VLA-4 oraz 58.5 ± 0.5 % komórek natywnych wykazywało obecność charakterystycznego dla komórek mezenchymalnych markera CD44, co umożliwiło ich identyfikację w mózgu szczura (Kontrolne vs modyfikowane hBM-MSCs $p < 0.05$) (ryc. 40A). Jednocześnie stwierdzono, że 48.5 ± 10.5 % komórek transfekowanych mRNA ITGA4 oraz 36.5 ± 8.5 % komórek kontrolnych wykazywało kolokalizację z antygenem ED1, typowego dla aktywowanych komórek mikrogleju i makrofagów (Kontrolne vs modyfikowane hBM-MSCs $p < 0.01$) (ryc. 40B). Wyniki te wskazują, iż 72 godziny po przeszczepie więcej komórek modyfikowanych genetycznie w stosunku do hBM-MSCs natywnych zostało sfagocytowanych przez komórki żerne biorcy.



Ryc. 40. Analiza fenotypu przeszczepionych hBM-MSCs obecnych w mózgu szczura z wywołanym podaniem ouabainy uszkodzeniem prążkowiecia w trzecim dniu od transplantacji. Wykresy przedstawiają procentowy udział komórek (A) CD44+ oraz (B) ED1+ w populacji wszystkich zidentyfikowanych hBM-MSCs obecnych w mózgu w obrębie grupy komórek transfekowanych mRNA ITGA4 (mRNA ITGA4 hBM-MSCs; słupki czerwone) i kontrolnych hBM-MSCs (Kontrolne hBM-MSCs; słupki fioletowe). Do określenia istotności statystycznej użyto testu typu III efektów stałych, a do porównania metody LMS. Wykresy pudełkowe prezentują rozproszenie i kształt rozkładu danych dla wartości badanej w porównywanych populacjach. Długość przedstawionych słupków jest równa rozstępowi ćwiartkowemu (Q1-Q3) danych, końcówki wąsów wskazują wartości minimalną i maksymalną, linia wewnątrz słupka wyznacza medianę, natomiast kwadrat średnią arytmetyczną, wartości odstające są przedstawione w postaci okręgów. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (n=6).

Podsumowując III etap moich badań, podane dotętniczo hBM-MSCs są widoczne w mózgu szczura w okolicy uszkodzenia wywołanego podaniem ouabainy. Na podstawie intensywności sygnału, generowanego przez nanocząstki tlenku żelaza, którymi wyznakowano przeszczepiane komórki, widocznego w obrazowaniu MRI można wnioskować, że więcej hBM-MSCs z nad-ekspresją VLA-4 w stosunku do komórek natywnych niemodyfikowanych genetycznie, jest widocznych w okolicy lezji prążkowiecia po ich podaniu dotętnicznym. Przez cały czas prowadzonych przez nas obserwacji przeszczepione hBM-MSCs pozostawały w obrębie naczyń krwionośnych mózgu, niektóre z nich 72 godziny po przeszczepie były widoczne w przestrzeni periwaskularnej.

6. Dyskusja wyników

Dotychczas prowadzone badania eksperymentalne z wykorzystaniem zwierzęcych modeli chorób OUN, w tym niedokrwienia mózgu, wykazały, że przeszczepione mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs) wywierają pozytywny efekt terapeutyczny niezależny od drogi podania komórek (Vu i in., 2014). Z dotychczasowych badań wynika, że wczesna transplantacja komórek jest najbardziej efektywna (Kumar i in., 2017; Yang i in., 2011). Przeniesienie tych obserwacji do zastosowań klinicznych wiąże się jednak z wyzwaniami, które muszą być podjęte na bazie dodatkowych badań podstawowych gdyż niektóre techniki aplikacji komórek u zwierząt mogą mieć istotne ograniczenia u ludzi. Na przykład podanie komórek do parenchymy mózgu wydaje się najbardziej efektywne z punktu widzenia dostarczenia ich w okolice uszkodzonej tkanki, jednak metoda ta wymaga bezpośredniego nakłucia mózgu, co u chorych po udarze, z uwagi na uszkodzenie naczyń krwionośnych oraz terapeutyczne obniżenie krzepliwości krwi byłoby ryzykowne i mogłoby spowodować krwotok. Najbardziej bezpieczna dla pacjenta wydaje się być transplantacja systemowa (dożylna), jednak w jej przypadku efekt terapeutyczny jest zależny od liczby komórek (Janowski, Walczak i Date, 2010), co wiąże się z koniecznością podania bardzo dużych dawek, które w sytuacji klinicznej są trudne do uzyskania. Ponadto duża liczba komórek przeszczepiona jednorazowo do krwioobiegu może prowadzić do zatorowości płucnej (Kean, Lin, Caplan i Dennis, 2013). W ostatnim czasie szybko rozwijająca się dziedzina neurointerwencji endowaskularnej zdobywa popularność, jako efektywna metoda terapii chorób mózgu i rdzenia kręgowego. Związane to jest z postępowaniem w udoskonalaniu metod obrazowania oraz cewników naczyniowych a także z coraz większym doświadczeniem lekarzy przeprowadzających te zabiegi. Najlepszym przykładem jest postęp w leczeniu pacjentów z udarem mózgu w ostrej fazie dzięki zastosowaniu przetętniczej trombektomii (Ramadan i in., 2017). Stąd wykorzystanie drogi dotętnicznej do podania środków terapeutycznych u pacjentów z udarem mózgu wydaje się szczególnie atrakcyjne ze względu na możliwość ich dostarczenia do uszkodzonej tkanki lub w bezpośrednie jej sąsiedztwo, co w przypadku transplantacji komórek pozwala na zmniejszenie ich minimalnej wymaganej dla wydajnego podania liczby. Wykorzystując to, Fraser i wsp. zaproponowali terapię uzupełniającą po trombektomii opartą o leczenie dotętnicze (Fraser i in., 2017). Podanie dotętnicze MSCs przy zoptymalizowanej, małej dawce komórek zostało udokumentowane jako efektywne terapeutycznie w modelu udaru mózgu u gryzoni (Yavagal i in., 2014). Jednak obserwowana dotychczas niska wydajność zasiedlania obszarów uszkodzenia przez przeszczepiane komórki (Argibay i in., 2017) wciąż stwarza przestrzeń dla wprowadzania ulepszeń tej metody poprzez opracowanie strategii, które zwiększyłyby liczbę MSCs zatrzymujących się przy ściance naczynia krwionośnego i zaindukowały inicjację diapedezy przeszczepionych komórek, aby wzmocnić ich skuteczność terapeutyczną. Kilka lat temu wykazano, że neuralne komórki macierzyste (ang. neural stem cells; NSC) sortowane pod kątem wysokiej ekspresji $\alpha 4$ (ITGA4), podjednostki heterodimeru integryny VLA-4, będącej białkiem adhezyjnym, charakteryzują się większą zdolnością zasiedlania uszkodzonego obszaru mózgu po podaniu dotętnicznym, co umożliwia uzyskanie silniejszego efektu terapeutycznego w modelu udaru mózgu u myszy (Guzman i in., 2008). W kolejnych badaniach dzięki zastosowaniu metod inżynierii genetycznej opartych na plazmidzie DNA uzyskano ekspresję obydwu podjednostek cząsteczki VLA-4 w prekursorach komórek glejowych (ang. glia progenitor cells; GRPs), co pozwoliło zwiększyć liczbę komórek wiążących się z aktywowanymi komórkami śródbłonna w warunkach *in vitro* (Gorelik i in., 2012) i zintensyfikować ich proces diapedezy w zwierzęcym modelu udaru mózgu (Jablonska i in., 2018).

Celem mojej pracy doktorskiej było opracowanie metody pozwalającej na zwiększenie zasiedlenia uszkodzonego obszaru mózgu przez przeszczepiane hBM-MSCs. Z uwagi na wcześniej

opisane zachęcające wyniki badań otrzymane w przypadku różnych typów komórek progenitorowych, wykazujących zwiększony poziom ekspresji VLA-4, jak również istotną rolę, jaką białko to odgrywa w procesie migracji i ekstrawazacji leukocytów zdecydowałam się na indukcję nad-ekspresji VLA-4 w hBM-MSCs. Ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego charakteryzują się endogenną ekspresją podjednostki $\beta 1$ (ITGB1) integrzyn (Majumdar i in., 2003), natomiast nie wykazują na swojej powierzchni obecności białka $\alpha 4$ (ITGA4), które jest konieczne do wytworzenia funkcjonalnego heterodimeru VLA-4. W moim projekcie postanowiłam wykorzystać opracowaną w zespole Neurobiologii Naprawczej technikę opartą na indukcji tymczasowej ekspresji integryny $\alpha 4$ poprzez wprowadzenie do komórek mRNA ITGA4 kodującego to białko (Nowakowski i in., 2017). Moje badania wykazały, że transfekcja hBM-MSCs mRNA ITGA4 skutecznie indukuje ekspresję podjednostki $\alpha 4$ integryny VLA-4. Metoda ta pozwala na uzyskanie powtarzalnej wysokiej skuteczności ekspresji białka $\alpha 4$ w 73 % hBM-MSCs w czasie 12 godzin od transfekcji w porównaniu z obserwowanym 4 % w populacji komórek natywnych, wykazujących naturalną endogenną jego ekspresję. W swoich badaniach założyłam, że nowo syntetyzowana podjednostka ITGA4 stworzy heterodimer z naturalnie występującą na powierzchni MSCs podjednostką $\beta 1$. Założenie to wydaje się być uzasadnione w świetle dotychczasowej wiedzy o biologii integrzyn, iż wytwarzanie podjednostek integrzyn jest naturalnie zbalansowane w komórkach i wyłącznie poprawnie sparowane heterodimery są umieszczane w błonie komórkowej (Lowell i Mayadas, 2012). Celem moich dalszych badań była analiza funkcjonalna transfekowanych mRNA ITGA4 hBM-MSCs, w tym ocena ich właściwości adhezyjnych, transmigracji i zdolności do zasiedlania uszkodzonych obszarów mózgu w porównaniu z komórkami natywnymi. W celu wizualizacji hBM-MSCs należało wybrać najbardziej optymalny znacznik komórek, który nie zmieniałby ich właściwości, pozwalając na długoczasowe obserwacje w doświadczeniach przeprowadzanych w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Optymalizacja znakowania hBM-MSCs stanowiła pierwszy etap moich badań, który poprzedził eksperymenty mające na celu ocenę właściwości komórek z nad-ekspresją białka ITGA4 będące głównym nurtem mojego projektu.

6.1. Optymalizacja znakowania komórek barwnikami w celu ich obrazowania *in vitro* i *in vivo*

W przypadku transplantacji komórek istotne znaczenie ma precyzyjna kontrola obszaru, do którego docierają komórki dawcy po podaniu oraz ocena ich dalszej dystrybucji w organizmie biorcy. Aktualnie dostępnych jest wiele technik umożliwiających identyfikację przeszczepionych komórek w obrazowaniu *pre-* i *post-mortem*. Metody te charakteryzują się różnym stopniem natężenia sygnału generowanego przez wybrany znacznik jak i jego trwałości, a także złożoności procedury znakowania (Andrzejewska i in., 2015). Jednym z najbardziej podstawowych podejść eksperymentalnych jest znakowanie komórek markerami fluorescencyjnymi tuż przed ich transplantacją, a następnie wizualizacja *post-mortem* przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego. Zaletą tej metody jest to, że znakowane komórki można wykryć bezpośrednio w skrawkach tkanki, bez potrzeby stosowania dodatkowych procedur koniecznych do ich identyfikacji, takich jak techniki immunohistochemiczne z udziałem przeciwciał skierowanych przeciwko specyficznym białkom przeszczepionych komórek. Co więcej, ze względu na krótki czas potrzebny dla przeprowadzenia procesu znakowania barwniki fluorescencyjne są bardziej odpowiednie do znakowania pierwotnych komórek macierzystych, w tym także MSCs, niż metody oparte na technikach inżynierii genetycznej, które wymagają przeprowadzenia procesu wyodrębnienia komórek (obejmującego między innymi sortowanie lub selekcję antybiotykową), o pożądanych przez nas cechach, co może powodować rozpoczęcie procesu ich różnicowania i wpływać negatywnie na właściwości terapeutyczne. Wadą znaczników fluorescencyjnych jest szybki spadek sygnału świecenia i zmiana wzorca proliferacji znakowanych

komórek. Niezwykle przydatne z punktu widzenia obserwacji przeszczepianych komórek są nanocząstki tlenku żelaza umożliwiające obrazowanie w MRI. Zastosowanie nanocząstek tlenku żelaza do znakowania komórek pozwala nie tylko na ich wizualizację *in vivo*, ale umożliwia śledzenie komórek w rezonansie magnetycznym w czasie rzeczywistym podczas zabiegu transplantacji, co jeśli zachodzi taka konieczność, daje możliwość modyfikacji techniki infuzji.

W moich badaniach porównałam trzy znaczniki stosowane do przyżyciowego barwienia hBM-MSCs, w tym CMFDA, mRNA eGFP i Molday ION. Analiza morfologii i funkcji znakowanych komórek miała na celu wytypowanie optymalnego markera, który z jednej strony byłby neutralny dla komórek a z drugiej strony generował silny i długotrwały sygnał, umożliwiający ich identyfikację zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*. Przeprowadzone przeze mnie obserwacje wykazały, że użyte do znakowania hBM-MSCs markery miały różny wpływ na komórki. Podczas analizy hBM-MSCs barwionych CMFDA okazało się, że znakowane komórki wykazują zmiany morfologiczne podczas krótkotrwałej 7-dniowej hodowli, a ich żywotność i aktywność metaboliczna jest znacząco niższa w porównaniu z komórkami nieznakowanymi. Dotychczasowe nieliczne doniesienia literaturowe wykazały, że CMFDA, który jest rutynowo stosowany zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*, powoduje zaburzenia poziomu aktywności metabolicznej i przeżywalności komórek (Kouris i in., 2012; Hensvold i in., 2015). Zmiany te mogą wynikać z faktu, że większość z omawianych technik znakowania wymaga zawieszenia wyjściowego koncentratu znacznika w DMSO, co dodatkowo może indukować w komórkach stres cytotoksyczny (Vaegler i in., 2014).

Koncepcja wykorzystania mRNA eGFP, jako znacznika komórek macierzystych stanowiła innowacyjny element moich badań. Znakowanie komórek poprzez wprowadzenie mRNA eGFP mogłoby być potencjalnie korzystne w sytuacji, w której analizie podlegałaby żywotność przeszczepianych komórek. Ponieważ proces translacji nie zachodzi w komórkach martwych, natomiast okres półtrwania eGFP jest stosunkowo krótki (około 3 godzin) to obecność sygnału fluorescencyjnego generowanego dzięki wprowadzeniu mRNA eGFP w sposób dość jednoznaczny pozwala na odróżnienie komórek żywych od martwych. Jednak zastosowana przeze mnie transfekcja hBM-MSCs mRNA eGFP nie spełniła wymogów zarówno w zakresie wydajności procesu znakowania jak i trwałości generowanego sygnału fluorescencyjnego. Ponadto komórki transfekowane mRNA eGFP wykazywały statystycznie niższą aktywność metaboliczną po 4 dniach hodowli w porównaniu z komórkami kontrolnymi. W większości dotychczas opublikowanych prac ekspresję białka GFP w MSCs indukowano przez wprowadzenie DNA kodującego białko GFP na drodze transdukcji wirusowej komórek. Autorzy takich badań wykazali, że wiązało się to z zahamowaniem proliferacji komórek, co przypisywano toksyczności wirionu wprowadzanego do cytoplazmy (Ji, Duan, Zheng i Li, 2015). W moich eksperymentach, zaobserwowałam podobny, negatywny efekt przy zastosowaniu chemicznej techniki transfekcji.

Trzeci z użytych przeze mnie znaczników Molday ION wydaje się być preferowanym markerem w przypadku znakowania hBM-MSCs. W przeciwieństwie do komórek barwionych CMFDA lub transfekowanych mRNA eGFP, Molday ION w standardowych warunkach hodowli komórek nie wpływał na aktywność metaboliczną hBM-MSCs. W badaniach mających na celu określenie fenotypu komórek okazało się, że hBM-MSCs znakowane Molday ION podczas ich 7-dniowej obserwacji w hodowli zachowują obecność markerów typowych dla komórek mezenchymalnych, w tym białek CD90 i CD44 porównywalną z komórkami natywnymi. Interesującą dla nas obserwacją był wzrost ekspresji antygenu SSEA4. SSEA4 stanowi marker komórek znajdujących się na wczesnym etapie rozwoju, jest

charakterystyczny między innymi dla zarodkowych komórek macierzystych. Można, więc przypuszczać, że znakowanie Molday ION w przypadku moich badań spowodowało powrót hBM-MSCs do stanu komórek o większym stopniu macierzystości jednocześnie częściowo blokując ich różnicowanie. Wzrost poziomu ekspresji SSEA4 jest prawdopodobnie związany z obecnością i intensywnymi podziałami komórkowymi progenitorowej populacji MSCs, która teoretycznie mogła pojawić się po znakowaniu Molday ION, jednak zweryfikowanie tego twierdzenia wymagałoby przeprowadzenia odrębnych badań. Wyniki innych autorów ujawniły, że hBM-MSCs hodowane na szalkach pokrytych żelatyną w pożywce nie zawierającej surowicy, natomiast z dodatkiem bFGF wykazują zwiększoną ekspresję SSEA4, a komórki te charakteryzują się silniejszą proliferacją (Battula i in., 2007). Wzmocniona proliferacja po wprowadzeniu do komórek nanocząstek tlenku żelaza była obserwowana między innymi w przypadku hodowanych w postaci neurosfer progenitorów neuralnych (NPC ang. Neural Progenitor Cells), ponadto obecność SPIO miała wpływ na dynamikę kształtowania trójwymiarowych agregatów komórek, które były mniejsze i bardziej homogenne, niż w przypadku komórek nieznakowanych (Lee, Yang, Cho i Cho, 2018). Wyniki badań Rosu-Myles i współpracowników dowodzą, że obecność SSEA4 na komórkach mezenchymalnych warunkuje ich zdolność do różnicowania w komórki tkanki kostnej, tłuszczowej i chrzęstnej (Rosu-Myles i in., 2013). Jednak, Schrobback i współpracownicy wykazali, że nie występuje korelacja pomiędzy ekspresją SSEA4 a potencjałem BM-MSCs do różnicowania w kierunku chondrocytów i osteoblastów, co więcej ekspresja tego markera zanika podczas przebiegu procesów chondrogenyzy i osteogenezy (Heiskanen i in., 2009; Schrobback i in., 2013). Analiza zdolności hBM-MSCs znakowanych Molday ION do różnicowania w kierunku adipocytów i osteoblastów przeprowadzona w naszych badaniach wykazała, że komórki po znakowaniu osiągały wyniki zbliżone do hBM-MSCs natywnych. W przypadku różnicowania się hBM-MSCs w chondrocyty, Molday ION powodował przyspieszenie procesu formowania typowej dla chondrogenyzy mikromasy. Z dostępnych w literaturze doniesień wynika, że MSCs znakowane Feridexem wykazują ograniczenie lub zahamowanie procesu chondrogenyzy (Bulte, Kraitchman, Mackay i Pittenger, 2004; Roeder i in., 2014), a także niewielkie zmiany w przebiegu procesu osteogenezy (Farrell i in., 2008). Podobnie, badania prowadzone przez Chen i wsp. wykazały, że zastosowany do znakowania MSCs - Ferucarbotran, zawierający nanocząstki tlenku żelaza w sposób istotny zmieniał przebieg różnicowania komórek w osteoblasty (Chen i in., 2010). Autorzy badający wpływ znakowania nanocząstkami żelaza na komórki MSCs izolowane z tłuszczu u psów również zauważyli zaburzenia procesu ich różnicowania do chondrocytów (Kolecka i in., 2017). W naszych eksperymentach w komórkach hBM-MSCs znakowanych Molday ION nie udało się zaobserwować niebieskiego zabarwienia mikromasy po zastosowaniu błękitu alcańskiego, świadczącego o zaawansowaniu procesu chondrogenyzy. Na tym etapie badań trudno jest stwierdzić czy otrzymany negatywny wynik reakcji jest dowodem na to, iż w hBM-MSCs po znakowaniu Molday ION proces chondrogenyzy nie przebiegał prawidłowo czy też może to wynikać z interferencji błękitu alcańskiego z ciemnym kolorem nanocząsteczek tlenku żelaza. Wydaje się, że do wyciągnięcia jednoznacznych wniosków należałoby wdrożyć bardziej zaawansowane metody analizy, takie jak ocena stopnia zróżnicowania komórek na podstawie analizy ekspresji genów aktywowanych podczas procesu chondrogenyzy. Badając wpływ znakowania Molday ION na ekspresję wybranych czynników neurotroficznych w hBM-MSCs obserwowałam niewielkie zmiany w poziomie ekspresji niektórych czynników wzrostu w komórkach po wyznakowaniu. Odchylenia poziomu ekspresji mRNA dla czynników wzrostu, w porównaniu do komórek natywnych, były widoczne w pierwszych 48 godzinach po znakowaniu, po czym w większości przypadków wracały do normy w kolejnych punktach czasowych obserwacji. Według innych autorów MSCs znakowane nanocząstkami tlenku żelaza wykazywały

zmiany poziomu mRNA kodującego GDNF, (Bashar i in., 2013; Chang i in., 2012). Z kolei Wang i współpracownicy nie odnotowali żadnych zmian w ekspresji czynników wzrostu wydzielanych przez komórki mezenchymalne izolowane z tłuszczu po ich znakowaniu SPIO (Wang i in., 2009). Te różnice w wynikach badań uzyskanych przez poszczególnych autorów mogą być spowodowane istnieniem nieznanymi zmiennymi, wynikającymi z niejednorodnych warunków prowadzenia hodowli komórek czy technik ich znakowania, a w przypadku nanocząstek tlenku żelaza mogą być związane zarówno ze składem rdzenia nanocząstek, jak i z powłoką, którą są one pokrywane.

Otrzymane przeze mnie wyniki wskazują na konieczność przeprowadzania restrykcyjnej oceny komórek po ich znakowaniu w każdym nowym układzie doświadczalnym przed przystąpieniem do transplantacji. Z moich badań wynika, że optymalnym znacznikiem dla hBM-MSC są nanocząstki tlenku żelaza skoniugowane z rodaminą (Molday ION), z uwagi na długi czas utrzymywania się znacznika w komórkach, prawidłową aktywność metaboliczną znakowanych hBM-MSC *in vitro* oraz jedynie znikome i krótkotrwałe zmiany w poziomie mRNA kodujących czynniki wzrostu syntetyzowane przez znakowane hBM-MSC. Zastosowanie Molday ION do znakowania komórek pozwala na ich wizualizację *in vivo* w rezonansie magnetycznym, co umożliwiła przeniesienie tej techniki bezpośrednio do kliniki (Janowski i in., 2014). Molday ION został przeze mnie wykorzystany do znakowania hBM-MSCs w dalszych eksperymentach stanowiących główny nurt moich badań, jakim było porównanie właściwości biologicznych komórek mezenchymalnych natywnych i wykazujących nad-ekspresję receptora VLA-4 integryny uczestniczącej w adhezji i transmigracji komórek w warunkach *in vitro* i po transplantacji systemowej u szczurów w modelu ogniskowego uszkodzenia mózgu.

6.2. Dobór optymalnej metody modyfikacji mezenchymalnych komórek macierzystych

Poprawa właściwości migracyjnych MSCs, w tym zdolności do ekstrawazacji, może być osiągnięta przy pomocy metod inżynierii genetycznej poprzez indukcję nad-ekspresji receptorów zaangażowanych w proces migracji, takich jak CXCR4 (patrz rozdział 1.6.2.). Modyfikacja komórek odbywa się najczęściej poprzez zastosowanie wektorów wirusowych, co jest nierozdzielnie związane z problemami dotyczącymi ryzyka transformacji nowotworowej komórek po przeszczepie spowodowanego zjawiskiem insercyjnej mutagenyzy. Pomimo wysokiej wydajności transfekcji wirusowej, w związku z obawami dotyczącymi bezpieczeństwa stosowania tej strategii, mało prawdopodobne wydaje się, aby technika ta znalazła szerokie zastosowanie kliniczne (Nowakowski i in., 2013). Ponadto długotrwała ekspresja transgenu wykraczająca poza czas wymagany do zajęcia procesu ekstrawazacji jest niepożądana i może prowadzić do nieprzewidzianych zmian właściwości przeszczepianych komórek. W związku z tym istnieje konieczność opracowania bezpieczniejszych, mających charakter przejściowy a tym samym klinicznie bardziej akceptowalnych metody inżynierii MSCs. W literaturze można znaleźć kilka przykładów modyfikacji MSCs opartych na wprowadzaniu do komórki plazmidowego DNA jednak sposoby te nie pozwalają osiągnąć wysokiej wydajności transfekcji (Cho, Lee i Ko, 2012; Elsler i in., 2012; Madeira i in., 2010; Park i Na, 2012). Ponadto prace te wykazały, że komórki MSCs są mało podatne na modyfikacje poprzez wprowadzenie plazmidowych cząsteczek DNA, a ich oporność jest tym silniejsza im większy jest rozmiar użytego plazmidu (Madeira i in., 2010; Ribeiro i in., 2012). W moich badaniach zdecydowaliśmy się zastosować metodę modyfikacji hBM-MSCs opartą o transfekcję mRNA ponieważ technika ta nie wymaga integracji wprowadzonego kwasu nukleinowego z genomem komórki a ponadto zapewnia indukują krótkotrwałej ekspresji białka charakteryzując się jednocześnie wysoką skutecznością transfekcji, co sprawia, że stanowi atrakcyjną alternatywę dla uzyskania przejściowej indukcji ekspresji genu ITGA4 w MSCs (Rejman i in., 2010).

Ryser i wsp. uzyskali wysoką sięgającą 90 % wydajność transfekcji MSCs mRNA CXCR4 przy użyciu techniki elektroporacji (Ryser i in., 2008). Jednak metoda ta prowadzi do przerwania ciągłości błony komórkowej co pociąga za sobą skutki uboczne najczęściej w postaci znacznego obniżenia żywotności komórek. Zatem wykorzystanie tej metody nie jest korzystne w przypadku komórek służących do transplantacji (Nowakowski i in., 2013). Kationowe nośniki chemiczne takie jak Lipofectamine 2000 są opisywane jako atrakcyjne czynniki transfekcyjne dla dostarczania mRNA do MSCs, zapewniając względnie wysoką żywotność komórek w połączeniu z dobrą wydajnością dostarczenia kwasów nukleinowych (Rejman i in., 2010; Levy i in., 2013). Jednak w przypadku badań prowadzonych w naszym zespole początkowe próby uzyskania ekspresji białka $\alpha 4$ w MSCs po wprowadzeniu mRNA ITGA4 przy użyciu Lipofectamine 2000 nie powiodły się pomimo, że kwas nukleinowy był dostarczany do komórek w wydajny sposób (Nowakowski i in., 2017). Prawdopodobną przyczynę niepowodzenia stanowiła znacznie wyższa liczba par zasad kodujących białko ITGA4 w porównaniu do transgenów użytych w wyżej wspomnianych badaniach innych autorów. W celu poprawy wydajności procesu transfekcji zastosowaliśmy strategię stabilizacji egzogennej mRNA przy użyciu białek SSB (ang. Single Stranded Binding Proteins; białka wiążące jednoniciowy DNA). Podobna metoda modyfikacji cząstek mRNA została użyta w celu transfekcji nowotworowej linii komórkowej HuH7 (ang. hepatocellular carcinoma cells), co zapewniało ochronę wprowadzonego mRNA przed degradacją przez endonukleazy (Shi i in., 2013). Tak przygotowane mRNA okazało się w naszych badaniach skuteczne w przypadku transfekcji komórek HEK293 jednak nie przyniosło oczekiwanych rezultatów w przypadku komórek hBM-MSCs. Wynik ten wskazuje na znaczne różnice w sposobie przetwarzania mRNA pomiędzy komórkami transformowanymi a populacjami pierwotnych komórek macierzystych, takich jak MSCs. Podczas procesu syntezy mRNA w warunkach *in vitro* standardowo stosowane analogi czapeczki są włączane w prawidłowej orientacji jedynie w 50 % przypadków. Dlatego też w kolejnym etapie naszej pracy dla poprawy wydajności procesu transfekcji MSCs zastosowaliśmy analog czapeczki – ARCA (ang. anti-reverse cap analogs), która gwarantuje jej włączenie wyłącznie w fizjologicznej orientacji podczas syntezy mRNA. W konsekwencji umożliwia ona prawidłowe rozpoznanie i inicjację procesu translacji białek (Stepinski i in., 2001). Jak się okazało stanowiło to kluczową modyfikację, która umożliwiła indukcję ekspresji mRNA ITGA4 u hBM-MSCs. Podczas gdy długotrwała ekspresja transgenów może być pożądana w wielu zastosowaniach, w przypadku moich badań charakterystyczna dla wprowadzonego mRNA krótkotrwała ekspresja białka dokładnie odpowiada zapotrzebowaniu w wykorzystywanym przeze mnie układzie doświadczalnym, który ma na celu zwiększenie przechodzenia genetycznie modyfikowanych komórek przez ścianę naczynia. Diapedeza jest procesem relatywnie szybkim (von Wedel-Parlow i in., 2011), podczas gdy permanentna nad-ekspresja receptorów zaangażowanych w migrację i diapedezę komórek może powodować problemy związane z bezpieczeństwem transplantacji zamiast zapewniać zwiększoną skuteczność terapeutyczną. W hipotetycznym scenariuszu klinicznym przeszczepiane MSCs można poddać procesowi transfekcji przy pomocy mRNA już w ciągu 12 godzin, aby następnie bez dalszych opóźnień podać modyfikowane komórki pacjentom. Zatem inżynieria genetyczna oparta o mRNA jest bardzo wygodnym narzędziem do przeprowadzania bardzo szybkich manipulacji ekspresji białek, indukowanych krótkoterminowo w przypadku przeszczepów komórek macierzystych.

6.3. Właściwości adhezyjne komórek związane z ekspresją molekuł przylegania

Proces diapedezy zarówno komórek układu odpornościowego jak i komórek macierzystych jest ściśle zależny od oddziaływania pomiędzy białkami adhezyjnymi zakotwiczonymi w ich błonie komórkowej oraz receptorami podlegającymi ekspresji w wyścielających naczyniach krwionośnych

komórkach śródbłonna. Do głównych rodzin białek adhezyjnych zaangażowanych w ten proces należą integryny, selektyny, immunoglobuliny oraz białka JAM (patrz rozdziały 1.5.2 oraz 1.5.4.). Modyfikacja profilu ekspresji każdej z cząsteczek zaliczanych do tych grup istotnie zmienia dynamikę ruchu komórek przepływających przez naczynie krwionośne. W dotychczasowych badaniach innych autorów, mających na celu określenie znaczenia poszczególnych receptorów dla przebiegu kolejnych etapów diapedezy wykorzystywano głównie strategie blokowania poszczególnych białek, co dostarczyło jedynie jednostkowej wiedzy na temat roli, jaką odgrywają. Blokowanie ligandów, takich jak ICAM-1 czy VCAM1 powodowało obniżenie liczby komórek wiążących się z warstwą aktywowanych komórek śródbłonna (Ko, Kean i Dennis, 2009; Rüster i in., 2006). Stosowanie antagonistów receptorów oraz przeciwciał skierowanych przeciwko białkom z rodziny selektyn pozwoliło stwierdzić, że zablokowanie ich aktywności powoduje spadek liczby leukocytów wiążących się ze ścianą aktywowanego naczynia krwionośnego oraz komórek podlegających procesowi toczenia się (Sloboda i Brooks, 2016; Riese i in., 2016). Hamowanie aktywności integryny VLA-4 prowadziło do zablokowania wiązania się komórek z powierzchnią śródbłonna (Rüster i in., 2006). Duże znaczenie integryny VLA-4 w przypadku procesu diapedezy i migracji komórek do OUN po ich podaniu systemowym zostało potwierdzone w przypadku komórek NSCs oraz GRPs (Gorelik i in., 2012; Jablonska i in., 2018; Rüster i in., 2006) jak również dla zasiedlania szpiku kostnego przez podane systemowo MSCs u myszy (Kumar i Ponnazhagan, 2007).

Badania te stały się dla nas podstawą do postawienia hipotezy, że nad-ekspresja ITGA4 może spowodować wzrost właściwości adhezyjnych modyfikowanych genetycznie hBM-MSCs. Pierwszym etapem tych badań była analiza *in vitro* z wykorzystaniem komór przepływowych (microfluidic device) z układem bardzo precyzyjnych kanałów, które mogą stanowić model naczyń krwionośnych. Obserwowany w komorach przepływ laminarny posłużył nam do badania zdolności poruszania się i zatrzymywania natywnych lub transfekowanych mRNA ITGA4 hBM-MSCs. W moich eksperymentach wykorzystywałam komory przepływowe, w których kanał był pokryty białkiem VCAM1, fizjologicznie występującym na aktywowanych komórkach śródbłonna. Zastosowanie VCAM1, wyścielającego kanał komory, przez który przepływały komórki było zasadne gdyż celem moich badań było określenie zachowania hBM-MSCs wynikającego wyłącznie z interakcji między obecnymi na komórkach cząsteczkami integryny ITGA4 i ich głównym ligandem - białkiem VCAM1.

W dostępnej literaturze niewiele jest prac, w których do doświadczeń *in vitro* wykorzystano technikę mikroprzepływów (Jablonska i in., 2018; Rüster i in., 2006). Może to wynikać z czasochłonności procesu liczenia komórek, co dotychczas było przeprowadzane manualnie i wymagało zaangażowania dużej liczby osób. Ocena zachowania komórek opierała się głównie o podanie liczby tych, które pozostawały związane ze śródbłonkiem naczyniowym już po zatrzymaniu przepływu, co powodowało, że liczne interakcje komórek ze ścianą naczyń zachodzące podczas samego ich ruchu nie były uwzględniane w analizie (Gorelik i in., 2012; Chamberlain, Smith, Rainger i Middleton, 2011). Dlatego na potrzeby mojego projektu, we współpracy ze specjalistami z zakresu programowania, opracowałam zaawansowane oprogramowanie o nazwie CellFlow Tracker do zautomatyzowanej, wysokoprzepustowej i kompleksowej analizy oddziaływań komórkowych z wykorzystaniem komór przepływowych. Wykonałam także walidację tak stworzonego oprogramowania w odniesieniu do pomiarów ruchu komórek w sposób manualny. Precyzyjny pomiar odległości, jaką poszczególne komórki pokonują pomiędzy kolejnymi klatkami nagrania zbieranego z częstotliwością 250 Hz zapewnia matrycę danych, na podstawie, której można obliczyć szereg parametrów opisujących ruch komórek. Przygotowałam algorytm analizy uzyskanych danych liczbowych umożliwiający wyodrębnienie komórek podlegających procesom takim jak zatrzymanie, toczenie się i pełzanie. Stworzenie programu CellFlow Tracker pozwoliło nadać nowy wymiar badaniom „dokowania”

komórek w modelach uwzględniających ich zachowanie podczas przepływu przez naczynia krwionośne, umożliwiając analizę na dużą skalę.

W naszych badaniach z użyciem komór przepływowych zarejestrowaliśmy różne fazy ruchu komórek przemieszczających się w kanale. Obserwowana przez nas kinetyka ruchu, jaką wykazywały hBM-MSCs przepływające w komorze była analogiczna do etapów procesu diapedezy leukocytów w naczyniach krwionośnych, takich jak płynięcie, toczenie się, zatrzymywanie i pełzanie komórek. Ten typ ruchu w moich doświadczeniach reprezentowały zarówno hBM-MSCs natywne jak i komórki transfekowane mRNA ITGA4. Eksperymenty z użyciem natywnych MSCs przeprowadzone przez innych badaczy z wykorzystaniem komór przepływowych pokrytych aktywowanymi komórkami śródbłonna w obecności występujących fizjologicznie w naczyniach krwionośnych sił ścinania o wartości 1 dyna/cm² wykazały, że natywne MSCs przepływały przez kanał komory, ale nie były w stanie toczyć się. Rüster i wsp. opisali, że toczenie się komórek mezenchymalnych było możliwe, ale tylko w obecności sił ścinania o wartościach niższych niż 1 dyna/cm², a po osiągnięciu tego progu proces ten był niemal całkowicie zahamowany (Rüster i in., 2006). Przyczyną odmiennych od naszych wyników innych autorów, gdzie nie wykryto żadnych interakcji między MSCs i aktywowanymi komórkami śródbłonna mogą być różne techniki stosowane do akwizycji obrazów. Należy wziąć pod uwagę fakt, że częstotliwość zbierania obrazu zastosowana przez autorów powyższych prac wynosiła 0.07 Hz i była znacznie niższa niż w opracowanym przeze mnie systemie (250 Hz). Istnieje, więc duże prawdopodobieństwo, że w cytowanych powyżej pracach wystąpiły interakcje, które następowały w przedziale czasu liczonym w milisekundach i nie zostały zaobserwowane ze względu na ograniczenia techniczne wykonywanych eksperymentów (Chamberlain i in., 2011).

Analizując wzorce ruchu hBM-MSCs natywnych lub komórek transfekowanych mRNA ITGA4 zaobserwowaliśmy, że obie populacje były zdolne do wiązania się z powierzchnią kanału komory przepływowej pokrytej VCAM1 jednak procent komórek zatrzymujących się był znacznie wyższy w przypadku komórek transfekowanych mRNA ITGA4 niż hBM-MSCs natywnych. Zatrzymanie hBM-MSCs było poprzedzone spowolnieniem prędkości ich przepływu przez kanał komory w porównaniu z szybkością ruchu tych komórek, które płynęły w kanale nie zatrzymując się. Analizując wszystkie fazy ruchu komórek przepływających przez kanał komory okazało się, że hBM-MSCs z nad-ekspresją integryn VLA-4 wykazują większą średnią prędkość przepływu, toczenia się i pełzania w porównaniu z komórkami natywnymi. Teoretycznie wystąpienie różnic w tempie przepływu komórek mogłoby być spowodowane różnicami w ich wielkości. W literaturze opisano możliwości biernego uwięzienia systemowo podanych MSCs w układzie krwionośnych ze względu na ich stosunkowo duży rozmiar w porównaniu ze światłem naczyń krwionośnych (Leibacher i Henschler, 2016). W naszych badaniach nie stwierdziliśmy różnicy w wielkości komórek pomiędzy populacjami hBM-MSCs natywnych i modyfikowanych, co wyklucza wpływ rozmiarów badanych obiektów, jako potencjalnego czynnika wpływającego na szybkość ich przepływu. Zwiększona liczba komórek wiążących się ze ścianą komory w przypadku komórek hBM-MSCs wykazujących nad-ekspresję ITGA4 wskazuje, że ich zatrzymanie w komorach przepływowych, stanowiących model naczyń krwionośnych *in vitro* wydaje się być związane z mechanizmem oddziaływania pomiędzy integryną VLA-4 i białkiem VCAM1, tak, więc stanowi proces aktywnego wiązania receptor-ligand.

6.4. Ocena komórek przeszczepianych dotętniczo u biorców w modelach uszkodzenia mózgu

Przeszczep komórek macierzystych na drodze infuzji dotętniczej pozwala zoptymalizować proces samej transplantacji dzięki możliwości przeprowadzenia podania celowanego, gdy komórki są

dostarczane niemal bezpośrednio do naczynia krwionośnego zaopatrującego obszar uszkodzenia. Technika ta pozwala zmniejszyć liczbę komórek koniecznych dla osiągnięcia ich terapeutycznej dawki jak również uniknąć ryzyka ich depozycji w niepożądanym lokalizacji narządowej, m.in. takich, jak naczynia krwionośne płuc (patrz rozdział 1.4.). Jednak wydajność zasiedlania struktur OUN w modelach zwierzęcych udaru mózgu przez przeszczepione dotętniczo MSCs wciąż pozostaje niewystarczająca. Doniesienia literaturowe wskazują, że stopień zasiedlania naczyń krwionośnych i parenchymy mózgu po dotętnicznym podaniu MSCs jest wysoce zróżnicowany (Walczak i in., 2008). Istotne znaczenie dla stopnia zasiedlania OUN przez podane dotętniczo komórki ma między innymi czas od momentu uszkodzenia mózgu do przeprowadzenia zabiegu transplantacji. Najlepsze efekty są osiągane, gdy komórki przeszczepia się w okresie 48-72 godzin od uszkodzenia. Podanie MSCs we wcześniejszym (24 godziny od uszkodzenia) oraz późniejszym czasie (7 dni od udaru) prowadzi do ich znikomej dystrybucji w obrębie lezji (Walczak i in., 2017). W moich badaniach czas od wywołania uszkodzenia mózgu do momentu podania komórek wynosił 48 godzin i został on wybrany między innymi ze względu na fakt, iż w literaturze można znaleźć wiele prac pokazujących, że przeszczep komórek w 48 godzin od uszkodzenia w modelach udaru mózgu prowadzi do redukcji obszaru lezji oraz neuroprotekcji. Ponadto w mojej pracy modyfikacja hBM-MSCs została zaprojektowana tak, aby zmienione genetycznie komórki miały zdolność do wchodzenia w interakcje z układem naczyń krwionośnych w sposób analogiczny do leukocytów, a szczyt infiltracji tych komórek przypada na okres od 48 do 72 godzin od uszkodzenia mózgu (Li i in., 2001; Guzman i in., 2008; Auriat, Rosenblum, Smith i Guzman, 2011). Innymi czynnikami wpływającymi na wydajność zasiedlania obszaru uszkodzenia przez komórki są zarówno szybkość ich infuzji jak i położenie samego cewnika naczyniowego (Walczak i in., 2017). Badania innych autorów wskazują, że część podanych MSCs podlega zatrzymaniu w naczyniach krwionośnych podczas pierwszego przejścia przez układ krążenia i są one widoczne zazwyczaj wewnątrz naczyń krwionośnych mózgu (Walczak i in., 2008; Cui i in., 2015). Moje wyniki potwierdzają te dane. Podane dotętniczo, w modelu ogniskowego uszkodzenia mózgu u szczura, hBM-MSCs natywne bądź transfekowane ITGA4 napływały zarówno do obszaru brzeżnego jak i lezji, pozostając zlokalizowane w obrębie naczyń krwionośnych mózgu bezpośrednio po ich podaniu. Jednak w porównaniu do natywnych hBM-MSCs, większa liczba komórek wykazujących nad-ekspresję VLA-4 ulegała zatrzymaniu w naczyniach krwionośnych uszkodzonej półkuli mózgu szczurów bezpośrednio po podaniu dotętnicznym. Podobnie wyższy odsetek hBM-MSCs transformowanych mRNA ITGA4 widoczny był w świetle naczyń krwionośnych trzeciego dnia od infuzji w porównaniu z komórkami niemodyfikowanymi genetycznie. Ten wzmożony efekt adhezyjny hBM-MSCs wykazujących nad-ekspresję VLA-4 do aktywowanej warstwy komórek śródbłonna naczyń krwionośnych szczura *in vivo* jest potwierdzeniem obserwowanej przeze mnie wcześniej wzmożonej zdolności tych komórek do przylegania *in vitro* w badaniach z wykorzystaniem komórki przepływowych, których kanał był pokryty białkiem VCAM1. Wyższy odsetek komórek, które pozostały wewnątrz światła naczyń krwionośnych w grupie zmodyfikowanych hBM-MSCs może być związany z silniejszą ekspresją integryny ITGA4. W związku z wzmocnionym połączeniem, stworzonym przez oddziaływanie integryny VLA-4 i białka VCAM1 pomiędzy komórkami śródbłonna a transfekowanymi mRNA ITGA4 hBM-MSCs, konieczny był wydłużony w porównaniu do komórek natywnych czas dla spadku ekspresji VLA-4 do poziomu umożliwiającego wystąpienie dalszych etapów ich migracji. Z drugiej strony, większa liczba komórek, które w związku z nad-ekspresją ITGA4 pozostały w naczyniach krwionośnych po przeszczepie dotętnicznym, może mieć pozytywny wpływ powodując zwiększenie terapeutycznego efektu przeszczepu MSCs, jednak potwierdzenie tej hipotezy wymaga przeprowadzenia doświadczeń, które wykraczają poza obszar badań dotychczas przeze mnie prowadzonych.

Przeprowadzona przeze mnie analiza hBM-MSCs znakowanych Molday ION z udziałem MRI wykazała, że liczba przeszczepionych komórek ulega znacznej redukcji już w ciągu pierwszych 24 godzin, a proces ich zaniku postępuje dalej w ciągu kolejnych dwóch dni. W literaturze można znaleźć pojedyncze prace pokazujące, że przeszczepione komórki podawane w modelach uszkodzenia mózgu wnikają do parenchymy po 6 godzinach od momentu transplantacji jednak ich liczba bardzo istotnie zmniejsza się w 24 godziny od przeszczepu (Keimpema i in., 2009; Janowski i in., 2013). W badaniach, w których MSCs były podawane w późniejszych punktach czasowych, po 24 lub 48 godzinach od wywołania udaru większość autorów opisuje wyłącznie ich lokalizację wewnątrz naczyń krwionośnych w mózgu, obserwowaną 24 godziny po przeszczepie (Mitkari i in., 2013; Cui i in., 2015). Wizualizacja komórek w dalszych punktach czasowych od ich podania pokazuje, że przeszczepione MSCs są stopniowo eliminowane z OUN, jednak można również znaleźć doniesienia o ich obecności w parenchymie mózgu u zwierząt w modelu udaru mózgu nawet po 14 dniach od infuzji (Gutiérrez-Fernández i in., 2011; Li i in., 2001). Prawdopodobną przyczyną zaniku przeszczepionych komórek może być ich redystrybucja do narządów obwodowych a także eliminacja w wyniku zniszczenia przez komórki układu immunologicznego. Interakcja pomiędzy podanymi dotętniczo MSCs a komórkami mikrogleju została zaobserwowana w mojej pracy, a także opisana przez Keimpema i wsp. (Keimpema i in., 2009; Khabbal i in., 2015). W moich badaniach więcej przeszczepionych hBM-MSCs z nad-ekspresją VLA-4 w porównaniu z komórkami natywnymi wykazuje ko-lokalizację z antygenem CD68. Według doniesień literaturowych w wyniku wprowadzenia do komórek egzogennej mRNA może dochodzić do wzrostu syntezy prozapalnych cytokin i czynników wzrostu, co zwiększa prawdopodobieństwo aktywacji komórek układu odpornościowego gospodarza po przeszczepie (Uchida, Kataoka i Itaka, 2015). Tak więc większy odsetek komórek modyfikowanych mRNA ITGA4 niż natywnych hBM-MSCs indukujących reakcję ze strony komórek układu odpornościowego gospodarza, obserwowany w moich eksperymentach, mógł być spowodowany wprowadzeniem do nich egzogennej mRNA. Stopień immunogenności egzogennej mRNA jest ściśle związany z typem chemicznych modyfikacji, jakim cząsteczka ta jest poddawana (Uchida, Kataoka i Itaka, 2015), dlatego otrzymany przeze mnie wynik wskazuje, że w przyszłości należałoby przeprowadzić proces optymalizacji cząsteczek mRNA użytych do transfekcji hBM-MSCs przed przystąpieniem do dalszych badań związanych z transplantacją komórek modyfikowanych genetycznie.

W mojej pracy przeszczepione dotętniczo MSCs były widoczne w obrazowaniu MRI w obrębie uszkodzonej ouabainą półkuli u zwierząt z ogniskowym uszkodzeniem mózgu do trzeciego dnia od ich podania. W ciągu pierwszych dwóch dni od transplantacji zarówno modyfikowane przy użyciu mRNA ITGA4 jak i natywne hBM-MSCs były widoczne w świetle naczyń krwionośnych znajdujących się w obrębie uszkodzonej półkuli mózgu. Po 3 dniach od transplantacji niektóre z komórek obserwowałam w przestrzeni periwaskularnej naczyń krwionośnych mózgu. Podobne wyniki badań zostały opisane przez naszych fińskich partnerów wspólnie realizowanego projektu międzynarodowego. W eksperymentach tych autorów szczerze MSCs, w których nad-ekspresja ITGA4 została zaindukowana poprzez transdukcję wektorem lentiwirusowym przemieszczały się do przestrzeni periwaskularnej w modelu niedokrwiennego uszkodzenia mózgu (MCAO – ang. Middle Cerebral Artery Occlusion) u biorców allogenicznym 72 godziny po podaniu. Zostało to potwierdzone przy użyciu obrazowania z wykorzystaniem mikroskopii dwufotonowej (Cui i in., 2017). Również w innych pracach można znaleźć informacje o wbudowywaniu się podanych dotętniczo MSCs w obręb ściany naczynia krwionośnego, prawdopodobnie poprzez ich integrację z warstwą komórek śródbłonna (Schmidt i in., 2006; Steingen i in., 2008; Langer i in., 2009; Cui i in., 2015). Przeszczepione komórki, które zostały zidentyfikowane w

przestrzeni periwaskularnej naczyń krwionośnych mózgu, musiały przekroczyć warstwę połączeń ścisłych pomiędzy komórkami śródbłonka współtworzącymi BBB. Badania innych autorów pokazują, że po wejściu MSCs w interakcje z komórkami śródbłonka dochodzi do zaniku połączeń ścisłych pomiędzy komórkami w warstwie endotelialnej, co pozwala przeszczepionym komórkom na bezpośredni kontakt z komórkami współtworzącymi ścianę naczynia krwionośnego (Schmidt i in., 2006). Obserwacje te dowodzą, że nie połączenia ścisłe pomiędzy komórkami śródbłonka, a raczej błona podstawna naczynia krwionośnego jest głównym czynnikiem ograniczającym ekstraswazację MSCs do tkanki. Ta okołonaczyniowa przestrzeń, w której przeszczepione komórki były widoczne w trzecim dniu od podania, stanowi niszę perycytów, które wykazują wiele cech wspólnych z MSCs. Perycyty i MSCs mają podobny profil antygenów powierzchniowych (CD146⁺, CD34⁻, CD45⁻, CD56⁻) i są w stanie różnicować się w osteoblasty i chondrocyty. Te i inne spójne cechy MSCs i perycytów doprowadziły do powstania hipotezy o ich wspólnym pochodzeniu (de Souza, Malta, Kashima Haddad i Covas, 2016; da Silva Meirelles i in., 2015). W literaturze możemy znaleźć prace pokazujące, że w mózgu myszy oraz człowieka można zidentyfikować komórki o cechach BM-MSCs, charakteryzujące się ekspresją odpowiednich markerów, a po izolacji w warunkach *in vitro* zdolne do przekształcenia się w adipocyty, chondrocyty i osteoblasty oraz komórki linii neuroektodermalnej co wskazywałoby, że przestrzeń okołonaczyniowa jest naturalnym siedliskiem BM-MSCs w mózgu (Kang i in., 2010; Paul i in., 2012). Badania prowadzone przez grupę Toma i wsp. wykazały, że szczurze MSCs podawane dotętniczo podlegały migracji do przestrzeni pomiędzy komórkami śródbłonka a błoną podstawną naczyń krwionośnych 72 godziny po transplantacji do mięśnia poddanego niedotlenieniu (Toma i in., 2009), co zgadza się z wynikami uzyskanymi w moich badaniach. Ponadto w omawianej pracy obserwowany był również duży spadek liczby przeszczepionych komórek, co autorzy przypisują śmierci komórek spowodowanej niskim poziomem tlenu w zatłoczonych mikronaczyniach. Autorzy postulują, że niedokrwienie powstające w środowisku otaczającym przeszczepione MSCs stanowiło czynnik odpowiedzialny za stymulację transmigracji tych komórek do przestrzeni periwaskularnej. Hipoteza ta wydaje się być bardzo prawdopodobna w świetle naszych badań i najnowszych ustaleń wskazujących na zależności występujące pomiędzy poziomem tlenu, ekspresją integryn ITGA4 i zdolnością MSCs do migracji. Choi i wsp. wykazali, że w warunkach niedotlenienia indukowany niedotlenieniem czynnik 1 α (HIF α 1; ang. Hypoxia-inducible factor 1 α) przemieszcza się do jąder komórkowych MSCs i powoduje spadek ekspresji integryny ITGA4 co powoduje zwiększoną migrację MSCs w kierunku czynnika chemotaktycznego i wzrost ekspresji MMP2 (Choi i in., 2016). Zjawiska te mogą prowadzić do rozpoczęcia procesu migracji MSCs. Podwyższony poziom białka ITGA4 zaindukowany przez mnie wprowadzeniem do komórek mRNA ITGA4 prawdopodobnie był odpowiedzialny za przedłużone oddziaływanie integryny VLA-4 obecnej na powierzchni przeszczepionych hBM-MSCs z białkiem VCAM1 podlegającym ekspresji na aktywowanych komórkach śródbłonka wyścielających naczynia krwionośne mózgu szczura. Rosnący poziom niedotlenienia w otaczającym środowisku mógł spowodować migrację komórek w trzecim dniu po transplantacji. W dostępnych w literaturze publikacjach czas potrzebny dla zajścia transmigracji MSCs przez komórki śródbłonka jest podawany, jako 120 minut (Teo i in., 2012; Schmidt i in., 2006), 240 minut (Steingen i in., 2008), 24 godziny (Rüster i in., 2006) czy 72 godziny w przypadku grupy Toma (Toma i in., 2009) i moich badań. Długi czas konieczny do uzyskania transmigracji hBM-MSCs może być związany z istnieniem połączeń ścisłych pomiędzy komórkami śródbłonka w mózgu, które tworzą barierę krew-mózg. Badania *in vitro* prowadzone przez inne zespoły badawcze wykazały, że transmigracja MSCs przez komórki śródbłonka BBB jest utrudniona w porównaniu z transmigracją przez komórki śródbłonka pochodzące ze źródła

innego niż mózg (Teo i in., 2012), co może powodować wydłużenie czasu transmigracji hBM-MSCs obserwowane w moich badaniach.

Zdolność MSCs do migracji w kierunku obszaru objętego procesem zapalnym jest dobrze znana, jednak lokalizacja, z której MSCs mogą oddziaływać na uszkodzoną tkankę pozostaje niejasna, zwłaszcza w obliczu wielu badań, w których efekt transplantacji MSCs wywołuje pozytywne rezultaty pomimo braku obecności przeszczepionych komórek w miejscu ich przeznaczenia (Gutiérrez-Fernández i in., 2013). Zaskakującym okazał się fakt, że w moich badaniach, dotyczących migracji hBM-MSCs *in vitro* z użyciem dwukomorowych naczynek typu transwell, zarówno w przypadku komórek wykazujących nad-ekspresję integryny ITGA4 jak i komórek natywnych, obecność dodatku homogenatu z uszkodzonej ouabainą tkanki mózgu umieszczonego w dolnej części komory powodowała zmniejszenie liczby migrujących hBM-MSCs. Według danych literaturowych MSCs mają zdolność migracji w kierunku czynników chemotaktycznych obecnych w uszkodzonej tkance, choć stopień ich odpowiedzi różni się w zależności od danego czynnika (Ponte i in., 2007). Generalnie przyjmuje się, że MSCs charakteryzuje zdolność migracji do miejsca uszkodzenia, co odbywa się na drodze oddziaływania chemotaktycznego pomiędzy wydzielanym przez uszkodzoną tkankę czynnikiem SDF-1 a receptorem CXCR4 obecnym na powierzchni migrujących komórek (Yu i in., 2015). Pomimo, że uzyskane przeze mnie wyniki analizy cytometrycznej hBM-MSCs ujawniły wysoki poziom ekspresji CXCR4, to szczegółowe badania wykazały, że lokalizacja tego receptora w komórkach nie jest typowa. Po wykonaniu barwień immunocytochemicznych okazało się, że białko CXCR4 wykrywane jest jedynie w jądrze komórkowym, natomiast nie obserwuje się jego obecności w błonie komórkowej hBM-MSCs. Można, więc domniemywać, że receptor CXCR4 w tym przypadku nie jest funkcjonalny, co potwierdzałoby niską migrację komórek w badaniach z wykorzystaniem szalek hodowlanych typu transwell. Podlegający zmianom podczas procesu różnicowania komórek wzór lokalizacji receptora CXCR4 został zaobserwowany w przypadku neuralnych komórek macierzystych z ludzkiej krwi pępowinowej (HUCB-NSCs; ang. ang. Human Umbilical Cord Blood-derived Neural Stem Cell). Zdolność migracji progenitorów neuralnych była analizowana w analogicznym do zastosowanego w mojej pracy układzie eksperymentalnym. Co ciekawe, homogenat z uszkodzonego ouabainą mózgu szczura indukował wzmoczoną chemotaksję komórek bez względu na lokalizację receptora CXCR-4 wykrywaną u HUCB-NSCs (Janowski, Lukomska i Domanska-Janik, 2011). Wydaje się, więc, że na migrację komórek w kierunku uszkodzenia mają wpływ także inne czynniki/receptory. Należy także rozważyć możliwość wpływu niektórych chemokin, takich jak CXCL12, CXCL13, CXCL16, CCL11, i CCL22, które zgodnie z doniesieniami literaturowymi mogą stymulować przeciwny do kierunku swojego gradientu kierunek migracji komórek (Smith, Whittall, Weksler i Middleton, 2012), jednak ich obecność nie była analizowana w moich badaniach.

Reasumując, przeprowadzone przeze mnie badania wykazały, że transfekcja hBM-MSCs mRNA ITGA4 jest metodą wystarczającą do uzyskania zwiększonego zasiedlania uszkodzonego rejonu mózgu przez podane dotętniczo komórki. Analiza wyników tych badań wskazuje, że przeszczepione hBM-MSCs są w stanie opuścić światło naczynia krwionośnego współtworzącego BBB i zasiedlać przestrzeń okołonaczyniową. Wydaje się, że błona podstawna ściany naczynia krwionośnego jest głównym czynnikiem odpowiedzialnym za hamowanie ich dalszej transmigracji do tkanki. Modyfikacja innych białek adhezyjnych na powierzchni MSCs a być może również stymulacja ekspresji enzymów proteolitycznych wydaje się w przyszłości obiecującym podejściem w terapii uszkodzeń OUN z zastosowaniem komórek macierzystych.

7. PODSUMOWANIE

- z wykorzystanych do przyżyciowego znakowania hBM-MSCs trzech różnych barwników fluorescencyjnych najbardziej optymalny wydaje się Molday ION zawierający nanocząstki tlenku żelaza i rodaminę B. Komórki wyznakowane Molday ION oceniane w hodowli *in vitro* zachowywały prawidłowe cechy morfologiczne i fenotypowe, prezentowały porównywalny z komórkami natywnymi poziom aktywności metabolicznej oraz ekspresji większości czynników wzrostu i zdolność do różnicowania w kierunku osteoblastów i adipocytów
- transfekcja hBM-MSCs mRNA ITGA4 powoduje, iż w modyfikowanych genetycznie komórkach pojawia się białko VLA-4, którego najwyższy poziom ekspresji oraz obecność w błonie komórkowej obserwuje się w okresie 8-12 godzin od wprowadzenia konstruktów
- hBM-MSCs modyfikowane przez wprowadzenie mRNA ITGA4 charakteryzują się wzmożoną aktywnością adhezyjną, co skutkuje zwiększeniem liczby komórek, które zatrzymują się podczas przepływu przez mikrokomory (microfluidic device) stanowiące model kapilarnych naczyń krwionośnych. Wzrost zdolności do przylegania komórek transfekowanych mRNA ITGA4 został potwierdzony w badaniach z wykorzystaniem szalek hodowlanych typu *transwell*
- hBM-MSCs znakowane Molday ION przeszczepiane do tętnicy szyjnej szczura w modelu uszkodzenia prądkowia ouabainą napływały do półkuli ipsilateralnej, co wykazano w MRI w czasie rzeczywistym. Na podstawie intensywności sygnału, generowanego przez nanocząstki tlenku żelaza można wnioskować, że więcej hBM-MSCs z nad-ekspresją VLA-4 w stosunku do komórek niemodyfikowanych genetycznie, było widocznych w okolicy lezji bezpośrednio po transplantacji
- podczas pierwszych dni obserwacji zarówno hBM-MSCs modyfikowane mRNA ITGA4 jak i komórki natywne znajdowały się wewnątrz światła naczyń krwionośnych mózgu. Po 72 godzinach od przeszczepu część komórek obydwu populacji hBM-MSCs była obserwowana poza światłem naczyń krwionośnych, przylegając do komórek śródbłonna od strony parenchymy mózgu

8. WNIOSKI

- wybór znaczników w celu późniejszej wizualizacji komórek nakłada obowiązek przeprowadzania restrykcyjnej oceny właściwości komórek po ich znakowaniu w każdym nowym układzie doświadczalnym przed przystąpieniem do transplantacji
- transfekcja ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego mRNA ITGA4 indukuje ekspresję podjednostki $\alpha 4$ integryny VLA-4, zwiększając zdolność adhezji zmodyfikowanych komórek obserwowaną zarówno *in vitro* jak i *in vivo* po ich transplantacji
- zwiększenie ekspresji receptora VLA-4 na powierzchni hBM-MSCs skutkuje efektywnym gromadzeniem się przeszczepianych komórek w naczyniach krwionośnych mózgu przebiegających w pobliżu lezji
- wydaje się, że wzmocnienie ekspresji dodatkowych receptorów na komórkach podawanych systemowo mogłoby promować ich przechodzenie przez ścianę naczyń krwionośnych i ukierunkowaną migrację

9. SPIS PIŚMIENICTWA

- Abbott, N.J., 2002. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *Journal of Anatomy*, 200(6), s. 629–638.
- Aggarwal, S. i Pittenger, M.F., 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105(4), s. 1815–1822.
- Agha-Hosseini, F., Jahani, M.-A., Jahani, M., Mirzaii-Dizgah, I. i Ali-Moghaddam, K., 2010. In vitro isolation of stem cells derived from human dental pulp. *Clinical Transplantation*, 24(2), s. E23-28.
- Ahrens, E.T. i Bulte, J.W.M., 2013. Tracking immune cells in vivo using magnetic resonance imaging. *Nature Reviews. Immunology*, 13(10), s. 755–763.
- Akimov, S.S., Krylov, D., Fleischman, L.F. i Belkin, A.M., 2000. Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin. *The Journal of Cell Biology*, 148(4), s. 825–838.
- Aldridge, V., Garg, A., Davies, N., Bartlett, D.C., Youster, J., Beard, H., Kavanagh, D.P., Kalia, N., Frampton, J., Lalor, P.F. i Newsome, P.N., 2012. Human mesenchymal stem cells are recruited to injured liver in a β 1-integrin and CD44 dependent manner. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 56(3), s. 1063–1073.
- Allen, T.A., Gracieux, D., Talib, M., Tokarz, D.A., Hensley, M.T., Cores, J., Vandergriff, A., Tang, J., de Andrade, J.B.M., Dinh, P.-U., Yoder, J.A. i Cheng, K., 2017. Angiopeliosis as an Alternative Mechanism of Cell Extravasation. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 35(1), s. 170–180.
- Álvarez, D., Levine, M. i Rojas, M., 2015. Regenerative medicine in the treatment of idiopathic pulmonary fibrosis: current position. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 8, s. 61–65.
- An, C., Cheng, Y., Yuan, Q. i Li, J., 2010. IGF-1 and BMP-2 induces differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into chondrocytes-like cells. *Annals of Biomedical Engineering*, 38(4), s. 1647–1654.
- Andreas, K., Georgieva, R., Ladwig, M., Mueller, S., Notter, M., Sittlinger, M. i Ringe, J., 2012. Highly efficient magnetic stem cell labeling with citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MRI tracking. *Biomaterials*, 33(18), s. 4515–4525.
- Andrzejewska, A., Nowakowski, A., Janowski, M., Bulte, J.W.M., Gilad, A.A., Walczak, P. i Lukomska, B., 2015. Pre- and postmortem imaging of transplanted cells. *International Journal of Nanomedicine*, 10, s. 5543–5559.
- Anghileri, E., Marconi, S., Pignatelli, A., Cifelli, P., Galié, M., Sbarbati, A., Krampera, M., Belluzzi, O. i Bonetti, B., 2008. Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 17(5), s. 909–916.
- Anon, 2018. *Cytobiochemia. Biochemia niektórych struktur komórkowych*. [online] Dostępne na: <<https://www.empik.com/cytobiochemia-biochemia-niektorych-struktur-komorkowych-klyszejko-stefanowicz-leokadia,282909,ksiazka-p>> [dostęp 3.08.2018].
- Anon, 2018. *Genetyka molekularna - Piotr Węgleński PWN - Pobierz pdf z Docer.pl*. [online] Docer.pl. Dostępne na: <<https://docer.pl/doc/1015es>> [dostęp 3.08.2018].
- Anon, 2018. *MRI in Practice, 4th Edition*. [online] Wiley.com. Dostępne na: <<https://www.wiley.com/en-us/MRI+in+Practice%2C+4th+Edition-p-9781444337433>> [dostęp 3.08.2018].
- Argibay, B., Trekker, J., Himmelreich, U., Beiras, A., Topete, A., Taboada, P., Pérez-Mato, M., Vieites-Prado, A., Iglesias-Rey, R., Rivas, J., Planas, A.M., Sobrino, T., Castillo, J. i Campos, F., 2017. Intraarterial route increases the risk of cerebral lesions after mesenchymal cell administration in animal model of ischemia. *Scientific Reports*, 7, s. 40758.
- Attar-Schneider, O., Zismanov, V., Drucker, L. i Gottfried, M., 2016. Secretome of human bone marrow mesenchymal stem cells: an emerging player in lung cancer progression and mechanisms of translation initiation. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(4), s. 4755–4765.
- Auriat, A.M., Rosenblum, S., Smith, T.N. i Guzman, R., 2011. Intravascular stem cell transplantation for stroke. *Translational Stroke Research*, 2(3), s. 250–265.

- Bahadur, S. i Pathak, K., 2012. Physicochemical and physiological considerations for efficient nose-to-brain targeting. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9(1), s. 19–31.
- Bai, L., Lennon, D.P., Eaton, V., Maier, K., Caplan, A.I., Miller, S.D. i Miller, R.H., 2009. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia*, 57(11), s. 1192–1203.
- Bakhru, S.H., Altiok, E., Highley, C., Delubac, D., Suhan, J., Hitchens, T.K., Ho, C. i Zappe, S., 2012. Enhanced cellular uptake and long-term retention of chitosan-modified iron-oxide nanoparticles for MRI-based cell tracking. *International Journal of Nanomedicine*, 7, s. 4613–4623.
- Bang, O.Y., Lee, J.S., Lee, P.H. i Lee, G., 2005. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Annals of Neurology*, 57(6), s. 874–882.
- Bashar, A.E., Metcalfe, A., Yanai, A., Laver, C., Häfeli, U.O., Gregory-Evans, C.Y., Moritz, O.L., Matsubara, J.A. i Gregory-Evans, K., 2013. Influence of Iron Oxide Nanoparticles on Innate and Genetically Modified Secretion Profiles of Mesenchymal Stem Cells. *IEEE transactions on magnetics*, 49(1), s. 389–393.
- Battula, V.L., Bareiss, P.M., Tremel, S., Conrad, S., Albert, I., Hojak, S., Abele, H., Schewe, B., Just, L., Skutella, T. i Bühring, H.-J., 2007. Human placenta and bone marrow derived MSC cultured in serum-free, b-FGF-containing medium express cell surface frizzled-9 and SSEA-4 and give rise to multilineage differentiation. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 75(4), s. 279–291.
- Beeravolu, N., McKee, C., Alamri, A., Mikhael, S., Brown, C., Perez-Cruet, M. i Chaudhry, G.R., 2017. Isolation and Characterization of Mesenchymal Stromal Cells from Human Umbilical Cord and Fetal Placenta. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (122).
- Belema-Bedada, F., Uchida, S., Martire, A., Kostin, S. i Braun, T., 2008. Efficient homing of multipotent adult mesenchymal stem cells depends on FROUNT-mediated clustering of CCR2. *Cell Stem Cell*, 2(6), s. 566–575.
- Bessis, N., GarciaCozar, F.J. i Boissier, M.-C., 2004. Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Therapy*, 11 Suppl 1, s. S10-17.
- Bhaskar, S., Stanwell, P., Cordato, D., Attia, J. i Levi, C., 2018. Reperfusion therapy in acute ischemic stroke: dawn of a new era? *BMC neurology*, 18(1), s. 8.
- Bianco, P., Robey, P.G. i Simmons, P.J., 2008. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, 2(4), s. 313–319.
- Blanchette, M. i Daneman, R., 2015. Formation and maintenance of the BBB. *Mechanisms of Development*, 138 Pt 1, s. 8–16.
- Blanquer, M., Moraleda, J.M., Iniesta, F., Gómez-Espuch, J., Meca-Lallana, J., Villaverde, R., Pérez-Espejo, M.Á., Ruíz-López, F.J., García Santos, J.M., Bleda, P., Izura, V., Sáez, M., De Mingo, P., Vivancos, L., Carles, R., Jiménez, J., Hernández, J., Guardiola, J., Del Rio, S.T., Antúnez, C., De la Rosa, P., Majado, M.J., Sánchez-Salinas, A., López, J., Martínez-Lage, J.F. i Martínez, S., 2012. Neurotrophic bone marrow cellular nests prevent spinal motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis patients: a pilot safety study. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 30(6), s. 1277–1285.
- Blocki, A., Wang, Y., Koch, M., Peh, P., Beyer, S., Law, P., Hui, J. i Raghunath, M., 2013. Not all MSCs can act as pericytes: functional in vitro assays to distinguish pericytes from other mesenchymal stem cells in angiogenesis. *Stem Cells and Development*, 22(17), s. 2347–2355.
- Bobis-Wozowicz, S., Miekus, K., Wybieralska, E., Jarocho, D., Zawisz, A., Madeja, Z. i Majka, M., 2011. Genetically modified adipose tissue-derived mesenchymal stem cells overexpressing CXCR4 display increased motility, invasiveness, and homing to bone marrow of NOD/SCID mice. *Experimental Hematology*, 39(6), s. 686-696.e4.
- Boltze, J., Arnold, A., Walczak, P., Jolkkonen, J., Cui, L. i Wagner, D.-C., 2015. The Dark Side of the Force - Constraints and Complications of Cell Therapies for Stroke. *Frontiers in Neurology*, 6, s. 155.
- Bonnema, S.J., Fast, S. i Hegedüs, L., 2014. The role of radioiodine therapy in benign nodular goitre. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 28(4), s. 619–631.

- Brandau, S., Jakob, M., Bruderek, K., Bootz, F., Giebel, B., Radtke, S., Mael, K., Jäger, M., Flohé, S.B. i Lang, S., 2014. Mesenchymal stem cells augment the anti-bacterial activity of neutrophil granulocytes. *PLoS One*, 9(9), s. e106903.
- Bronckaers, A., Hilkens, P., Martens, W., Gervois, P., Ratajczak, J., Struys, T. i Lambrechts, I., 2014. Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. *Pharmacology & Therapeutics*, 143(2), s. 181–196.
- Brooke, G., Tong, H., Levesque, J.-P. i Atkinson, K., 2008. Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta. *Stem Cells and Development*, 17(5), s. 929–940.
- Brown, J.M., Nemeth, K., Kushnir-Sukhov, N.M., Metcalfe, D.D. i Mezey, E., 2011. Bone marrow stromal cells inhibit mast cell function via a COX2-dependent mechanism. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 41(4), s. 526–534.
- Bulte, J.W.M., Kraitchman, D.L., Mackay, A.M. i Pittenger, M.F., 2004. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells is inhibited after magnetic labeling with ferumoxides. *Blood*, 104(10), s. 3410–3412; author reply 3412–3413.
- Candelario-Jalil, E., Taheri, S., Yang, Y., Sood, R., Grossetete, M., Estrada, E.Y., Fiebich, B.L. i Rosenberg, G.A., 2007. Cyclooxygenase inhibition limits blood-brain barrier disruption following intracerebral injection of tumor necrosis factor-alpha in the rat. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 323(2), s. 488–498.
- Canesi, M., Giordano, R., Lazzari, L., Isalberti, M., Isaias, I.U., Benti, R., Rampini, P., Marotta, G., Colombo, A., Cereda, E., Dipaola, M., Montemurro, T., Viganò, M., Budelli, S., Montelatici, E., Lavazza, C., Cortelezzi, A. i Pezzoli, G., 2016. Finding a new therapeutic approach for no-option Parkinsonisms: mesenchymal stromal cells for progressive supranuclear palsy. *Journal of Translational Medicine*, 14(1), s. 127.
- Cantinieaux, D., Quertainmont, R., Blacher, S., Rossi, L., Wanet, T., Noël, A., Brook, G., Schoenen, J. i Franzen, R., 2013. Conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves recovery after spinal cord injury in rats: an original strategy to avoid cell transplantation. *PLoS One*, 8(8), s. e69515.
- Caplan, A.I., 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 9(5), s. 641–650.
- Caplan, A.I., 2008. All MSCs are pericytes? *Cell Stem Cell*, 3(3), s. 229–230.
- Caplan, A.I., 2017. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Translational Medicine*, 6(6), s. 1445–1451.
- Caplan, A.I. i Dennis, J.E., 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98(5), s. 1076–1084.
- Cassatella, M.A., Mosna, F., Micheletti, A., Lisi, V., Tamassia, N., Cont, C., Calzetti, F., Pelletier, M., Pizzolo, G. i Krampera, M., 2011. Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 29(6), s. 1001–1011.
- Castanheira, P., Torquetti, L.T., Magalhães, D.R.S., Nehemy, M.B. i Goes, A.M., 2009. DAPI diffusion after intravitreal injection of mesenchymal stem cells in the injured retina of rats. *Cell Transplantation*, 18(4), s. 423–431.
- Chamberlain, G., Smith, H., Rainger, G.E. i Middleton, J., 2011. Mesenchymal stem cells exhibit firm adhesion, crawling, spreading and transmigration across aortic endothelial cells: effects of chemokines and shear. *PLoS One*, 6(9), s. e25663.

- Chang, Y.-K., Liu, Y.-P., Ho, J.H., Hsu, S.-C. i Lee, O.K., 2012. Amine-surface-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles interfere with differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 30(9), s. 1499–1506.
- Chapel, A., Bertho, J.M., Bensidhoum, M., Fouillard, L., Young, R.G., Frick, J., Demarquay, C., Cuvelier, F., Mathieu, E., Trompier, F., Dudoignon, N., Germain, C., Mazurier, C., Aigueperse, J., Borneman, J., Gorin, N.C., Gourmelon, P. i Thierry, D., 2003. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *The Journal of Gene Medicine*, 5(12), s. 1028–1038.
- Chartoff, E.H., Damez-Werno, D., Sonntag, K.C., Hassinger, L., Kaufmann, D.E., Peterson, J., McPhie, D., Cataldo, A.M. i Cohen, B.M., 2011. Detection of intranasally delivered bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the lesioned mouse brain: a cautionary report. *Stem Cells International*, 2011, s. 586586.
- Chatterjee, D., Marquardt, N., Tufa, D.M., Hatlapatka, T., Hass, R., Kasper, C., von Kaisenberg, C., Schmidt, R.E. i Jacobs, R., 2014. Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Utilize Activin-A to Suppress Interferon- γ Production by Natural Killer Cells. *Frontiers in Immunology*, [online] 5. Dostępne na: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4278046/>> [dostęp 2.08.2018].
- Chen, J., Zhang, Z.G., Li, Y., Wang, L., Xu, Y.X., Gautam, S.C., Lu, M., Zhu, Z. i Chopp, M., 2003. Intravenous administration of human bone marrow stromal cells induces angiogenesis in the ischemic boundary zone after stroke in rats. *Circulation Research*, 92(6), s. 692–699.
- Chen, L., Tredget, E.E., Wu, P.Y.G. i Wu, Y., 2008. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*, 3(4), s. e1886.
- Chen, P.-M., Liu, K.-J., Hsu, P.-J., Wei, C.-F., Bai, C.-H., Ho, L.-J., Sytwu, H.-K. i Yen, B.L., 2014. Induction of immunomodulatory monocytes by human mesenchymal stem cell-derived hepatocyte growth factor through ERK1/2. *Journal of Leukocyte Biology*, 96(2), s. 295–303.
- Chen, Y.-C., Hsiao, J.-K., Liu, H.-M., Lai, I.-Y., Yao, M., Hsu, S.-C., Ko, B.-S., Chen, Y.-C., Yang, C.-S. i Huang, D.-M., 2010. The inhibitory effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (Ferucarbotran) on osteogenic differentiation and its signaling mechanism in human mesenchymal stem cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 245(2), s. 272–279.
- Chen, Y.-T., Wei, J.-D., Wang, J.-P., Lee, H.-H., Chiang, E.-R., Lai, H.-C., Chen, L.-L., Lee, Y.-T., Tsai, C.-C., Liu, C.-L. i Hung, S.-C., 2011. Isolation of mesenchymal stem cells from human ligamentum flavum: implicating etiology of ligamentum flavum hypertrophy. *Spine*, 36(18), s. E1193-1200.
- Cheng, H., Byrka-Bishop, M., Zhang, C.T., Kastrup, C.J., Hwang, N.S., Tai, A.K., Lee, W.W., Xu, X., Nahrendorf, M., Langer, R. i Anderson, D.G., 2012. Stem cell membrane engineering for cell rolling using peptide conjugation and tuning of cell-selectin interaction kinetics. *Biomaterials*, 33(20), s. 5004–5012.
- Cho, J.-W., Lee, C.-Y. i Ko, Y., 2012. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells overexpressing human forkhead box A2 gene in the regeneration of damaged liver tissues. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 27(8), s. 1362–1370.
- Choi, J.H., Lee, Y.B., Jung, J., Hwang, S.G., Oh, I.-H. i Kim, G.J., 2016. Hypoxia Inducible Factor-1 α Regulates the Migration of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells via Integrin α 4. *Stem Cells International*, 2016, s. 7932185.
- Chomczynski, P. i Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), s. 156–159.
- Colter, D.C., Class, R., DiGirolamo, C.M. i Prockop, D.J., 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), s. 3213–3218.
- Colter, D.C., Sekiya, I. i Prockop, D.J., 2001. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(14), s. 7841–7845.
- Connick, P., Kolappan, M., Crawley, C., Webber, D.J., Patani, R., Michell, A.W., Du, M.-Q., Luan, S.-L., Altmann, D.R., Thompson, A.J., Compston, A., Scott, M.A., Miller, D.H. i Chandran, S., 2012. Autologous

mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *The Lancet. Neurology*, 11(2), s. 150–156.

- Consentius, C., Reinke, P. i Volk, H.-D., 2015. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stromal cells: what has been seen in vitro and in vivo? *Regenerative Medicine*, 10(3), s. 305–315.
- Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G.L., Pistoia, V. i Uccelli, A., 2006. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 107(1), s. 367–372.
- Correale, J. i Villa, A., 2009. Cellular elements of the blood-brain barrier. *Neurochemical Research*, 34(12), s. 2067–2077.
- Corselli, M., Chen, C.-W., Sun, B., Yap, S., Rubin, J.P. i Péault, B., 2012. The tunica adventitia of human arteries and veins as a source of mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 21(8), s. 1299–1308.
- Corti, S., Nizzardo, M., Nardini, M., Donadoni, C., Salani, S., Simone, C., Falcone, M., Riboldi, G., Govoni, A., Bresolin, N. i Comi, G.P., 2010. Systemic transplantation of c-kit+ cells exerts a therapeutic effect in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Human Molecular Genetics*, 19(19), s. 3782–3796.
- Cotarelo, C.L., Schad, A., Kirkpatrick, C.J., Sleeman, J.P., Springer, E., Schmidt, M. i Thaler, S., 2016. Detection of cellular senescence within human invasive breast carcinomas distinguishes different breast tumor subtypes. *Oncotarget*, 7(46), s. 74846–74859.
- Covas, D.T., Panepucci, R.A., Fontes, A.M., Silva, W.A., Orellana, M.D., Freitas, M.C.C., Neder, L., Santos, A.R.D., Peres, L.C., Jamur, M.C. i Zago, M.A., 2008. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Experimental Hematology*, 36(5), s. 642–654.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P.-N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B.M., Badyrak, S., Buhring, H.-J., Jacobino, J.-P., Lazzari, L., Huard, J. i Péault, B., 2008. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 3(3), s. 301–313.
- Crumrine, R.C., Marder, V.J., Taylor, G.M., Lamanna, J.C., Tsipis, C.P., Scuderi, P., Petteway, S.R. i Arora, V., 2011. Intra-arterial administration of recombinant tissue-type plasminogen activator (rt-PA) causes more intracranial bleeding than does intravenous rt-PA in a transient rat middle cerebral artery occlusion model. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 3(1), s. 10.
- Cui, L., Kerkelä, E., Bakreen, A., Nitzsche, F., Andrzejewska, A., Nowakowski, A., Janowski, M., Walczak, P., Boltze, J., Lukomska, B. i Jolkkonen, J., 2015. The cerebral embolism evoked by intra-arterial delivery of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells in rats is related to cell dose and infusion velocity. *Stem Cell Research & Therapy*, 6, s. 11.
- Cui, L.-L., Nitzsche, F., Pryazhnikov, E., Tibeykina, M., Tolppanen, L., Rytönen, J., Huhtala, T., Mu, J.-W., Khiroug, L., Boltze, J. i Jolkkonen, J., 2017. Integrin $\alpha 4$ Overexpression on Rat Mesenchymal Stem Cells Enhances Transmigration and Reduces Cerebral Embolism After Intracarotid Injection. *Stroke*, 48(10), s. 2895–2900.
- Czernik, M., Fidanza, A., Sardi, M., Galli, C., Brunetti, D., Malatesta, D., Della Salda, L., Matsukawa, K., Ptak, G.E. i Loi, P., 2013. Differentiation potential and GFP labeling of sheep bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(1), s. 134–143.
- Dai, W., Hale, S.L., Martin, B.J., Kuang, J.-Q., Dow, J.S., Wold, L.E. i Kloner, R.A., 2005. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation*, 112(2), s. 214–223.
- Danielyan, L., Schäfer, R., von Ameln-Mayerhofer, A., Bernhard, F., Verleysdonk, S., Buadze, M., Lourhami, A., Koehle, C., Proksch, B., Weissert, R., Reichardt, H.M., van den Brandt, J., Buniatian, G.H., Schwab, M., Gleiter, C.H. i Frey, W.H., 2011. Therapeutic efficacy of intranasally delivered mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson disease. *Rejuvenation Research*, 14(1), s. 3–16.
- De Becker, A., Van Hummelen, P., Bakkus, M., Vande Broek, I., De Wever, J., De Waele, M. i Van Riet, I., 2007. Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow

endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Haematologica*, 92(4), s. 440–449.

- Dennis, J.E. i Charbord, P., 2002. Origin and differentiation of human and murine stroma. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 20(3), s. 205–214.
- Dennis, J.E., Merriam, A., Awadallah, A., Yoo, J.U., Johnstone, B. i Caplan, A.I., 1999. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 14(5), s. 700–709.
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S. i Gianni, A.M., 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10), s. 3838–3843.
- Dimitrijevic, O.B., Stamatovic, S.M., Keep, R.F. i Andjelkovic, A.V., 2006. Effects of the chemokine CCL2 on blood-brain barrier permeability during ischemia-reperfusion injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 26(6), s. 797–810.
- Djouad, F., Charbonnier, L.-M., Bouffi, C., Louis-Pence, P., Bony, C., Apparailly, F., Cantos, C., Jorgensen, C. i Noël, D., 2007. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(8), s. 2025–2032.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. i Horwitz, E., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), s. 315–317.
- Eliopoulos, N., Zhao, J., Bouchentouf, M., Forner, K., Birman, E., Yuan, S., Boivin, M.-N. i Martineau, D., 2010. Human marrow-derived mesenchymal stromal cells decrease cisplatin nephrotoxicity in vitro and in vivo and enhance survival of mice post-intraperitoneal injection. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 299(6), s. F1288–1298.
- Elsler, S., Schetting, S., Schmitt, G., Kohn, D., Madry, H. i Cucchiari, M., 2012. Effective, safe nonviral gene transfer to preserve the chondrogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells. *The Journal of Gene Medicine*, 14(7), s. 501–511.
- Eom, Y.W., Shim, K.Y. i Baik, S.K., 2015. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 30(5), s. 580–589.
- Erices, A., Conget, P. i Minguell, J.J., 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology*, 109(1), s. 235–242.
- Evans, M.S., Chaurette, J.P., Adams, S.T., Reddy, G.R., Paley, M.A., Aronin, N., Prescher, J.A. i Miller, S.C., 2014. A synthetic luciferin improves bioluminescence imaging in live mice. *Nature Methods*, 11(4), s. 393–395.
- Fan, H., Zhao, G., Liu, L., Liu, F., Gong, W., Liu, X., Yang, L., Wang, J. i Hou, Y., 2012. Pre-treatment with IL-1 β enhances the efficacy of MSC transplantation in DSS-induced colitis. *Cellular & Molecular Immunology*, 9(6), s. 473–481.
- Farrell, E., Wielopolski, P., Pavljasevic, P., van Tiel, S., Jahr, H., Verhaar, J., Weinans, H., Krestin, G., O'Brien, F.J., van Osch, G. i Bernsen, M., 2008. Effects of iron oxide incorporation for long term cell tracking on MSC differentiation in vitro and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 369(4), s. 1076–1081.
- Feng, J., Mantesso, A., De Bari, C., Nishiyama, A. i Sharpe, P.T., 2011. Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(16), s. 6503–6508.
- Ferrari, A., Hannouche, D., Oudina, K., Bourguignon, M., Meunier, A., Sedel, L. i Petite, H., 2001. In vivo tracking of bone marrow fibroblasts with fluorescent carbocyanine dye. *Journal of Biomedical Materials Research*, 56(3), s. 361–367.

- Filippi, M., Boido, M., Pasquino, C., Garello, F., Boffa, C. i Terreno, E., 2016. Successful in vivo MRI tracking of MSCs labeled with Gadoteridol in a Spinal Cord Injury experimental model. *Experimental Neurology*, 282, s. 66–77.
- Fink, K.D., Rossignol, J., Crane, A.T., Davis, K.K., Bombard, M.C., Bavar, A.M., Clerc, S., Lowrance, S.A., Song, C., Lescaudron, L. i Dunbar, G.L., 2013. Transplantation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells into the striata of R6/2 mice: behavioral and neuropathological analysis. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(5), s. 130.
- François, S., Bensidhoum, M., Mouiseddine, M., Mazurier, C., Allenet, B., Semont, A., Frick, J., Saché, A., Bouchet, S., Thierry, D., Gourmelon, P., Gorin, N.-C. i Chapel, A., 2006. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 24(4), s. 1020–1029.
- Fraser, J.F., Maniskas, M., Trout, A., Lukins, D., Parker, L., Stafford, W.L., Alhajeri, A., Roberts, J. i Bix, G.J., 2017. Intra-arterial verapamil post-thrombectomy is feasible, safe, and neuroprotective in stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 37(11), s. 3531–3543.
- Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K. i Lalykina, K.S., 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and Tissue Kinetics*, 3(4), s. 393–403.
- Friedenstein, A.J., Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I. i Frolova, G.P., 1968. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6(2), s. 230–247.
- Gao, P., Han, P., Jiang, D., Yang, S., Cui, Q. i Li, Z., 2017. Effects of the donor age on proliferation, senescence and osteogenic capacity of human urine-derived stem cells. *Cytotechnology*, 69(5), s. 751–763.
- Gao, S., Mao, F., Zhang, B., Zhang, L., Zhang, X., Wang, M., Yan, Y., Yang, T., Zhang, J., Zhu, W., Qian, H. i Xu, W., 2014. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce macrophage M2 polarization through the nuclear factor- κ B and signal transducer and activator of transcription 3 pathways. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 239(3), s. 366–375.
- Gerdoni, E., Gallo, B., Casazza, S., Musio, S., Bonanni, I., Pedemonte, E., Mantegazza, R., Frassoni, F., Mancardi, G., Pedotti, R. i Uccelli, A., 2007. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Annals of Neurology*, 61(3), s. 219–227.
- Ghannam, S., Pène, J., Moquet-Torcy, G., Torcy-Moquet, G., Jorgensen, C. i Yssel, H., 2010. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 185(1), s. 302–312.
- Gieseke, F., Böhringer, J., Bussolari, R., Dominici, M., Handgretinger, R. i Müller, I., 2010. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood*, 116(19), s. 3770–3779.
- Girdlestone, J., Limbani, V.A., Cutler, A.J. i Navarrete, C.V., 2009. Efficient expansion of mesenchymal stromal cells from umbilical cord under low serum conditions. *Cytotherapy*, 11(6), s. 738–748.
- Glenn, J.D., Smith, M.D., Calabresi, P.A. i Whartenby, K.A., 2014. Mesenchymal stem cells differentially modulate effector CD8⁺ T cell subsets and exacerbate experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 32(10), s. 2744–2755.
- Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P.J., Lam, E.W.-F. i Dazzi, F., 2005. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest energy of activated T cells. *Blood*, 105(7), s. 2821–2827.
- Gorelik, M., Orukari, I., Wang, J., Galpoththawela, S., Kim, H., Levy, M., Gilad, A.A., Bar-Shir, A., Kerr, D.A., Levchenko, A., Bulte, J.W.M. i Walczak, P., 2012. Use of MR cell tracking to evaluate targeting of

glial precursor cells to inflammatory tissue by exploiting the very late antigen-4 docking receptor. *Radiology*, 265(1), s. 175–185.

- Govindasamy, V., Ronald, V.S., Abdullah, A.N., Nathan, K.R.G., Ab Aziz, Z. a. C., Abdullah, M., Musa, S., Kasim, N.H.A. i Bhonde, R.R., 2011. Differentiation of dental pulp stem cells into islet-like aggregates. *Journal of Dental Research*, 90(5), s. 646–652.
- Griffin, M.D., Ryan, A.E., Alagesan, S., Lohan, P., Treacy, O. i Ritter, T., 2013. Anti-donor immune responses elicited by allogeneic mesenchymal stem cells: what have we learned so far? *Immunology and Cell Biology*, 91(1), s. 40–51.
- Gronthos, S., Franklin, D.M., Leddy, H.A., Robey, P.G., Storms, R.W. i Gimble, J.M., 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of Cellular Physiology*, 189(1), s. 54–63.
- Gronthos, S., Zannettino, A.C.W., Hay, S.J., Shi, S., Graves, S.E., Kortessidis, A. i Simmons, P.J., 2003. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 9), s. 1827–1835.
- Gschweng, E.H., McCracken, M.N., Kaufman, M.L., Ho, M., Hollis, R.P., Wang, X., Saini, N., Koya, R.C., Chodon, T., Ribas, A., Witte, O.N. i Kohn, D.B., 2014. HSV-sr39TK positron emission tomography and suicide gene elimination of human hematopoietic stem cells and their progeny in humanized mice. *Cancer Research*, 74(18), s. 5173–5183.
- Gu, W., Zhang, F., Xue, Q., Ma, Z., Lu, P. i Yu, B., 2010. Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells reduces lesion volume and induces axonal regrowth of injured spinal cord. *Neuropathology: Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 30(3), s. 205–217.
- Guo, J., Zhang, H., Xiao, J., Wu, J., Ye, Y., Li, Z., Zou, Y. i Li, X., 2013. Monocyte chemotactic protein-1 promotes the myocardial homing of mesenchymal stem cells in dilated cardiomyopathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), s. 8164–8178.
- Gutiérrez-Fernández, M., Rodríguez-Frutos, B., Alvarez-Grech, J., Vallejo-Cremades, M.T., Expósito-Alcaide, M., Merino, J., Roda, J.M. i Díez-Tejedor, E., 2011. Functional recovery after hematic administration of allogenic mesenchymal stem cells in acute ischemic stroke in rats. *Neuroscience*, 175, s. 394–405.
- Gutiérrez-Fernández, M., Rodríguez-Frutos, B., Ramos-Cejudo, J., Teresa Vallejo-Cremades, M., Fuentes, B., Cerdán, S. i Díez-Tejedor, E., 2013. Effects of intravenous administration of allogenic bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on functional recovery and brain repair markers in experimental ischemic stroke. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(1), s. 11.
- Guzman, R., De Los Angeles, A., Cheshier, S., Choi, R., Hoang, S., Liauw, J., Schaar, B. i Steinberg, G., 2008. Intracarotid injection of fluorescence activated cell-sorted CD49d-positive neural stem cells improves targeted cell delivery and behavior after stroke in a mouse stroke model. *Stroke*, 39(4), s. 1300–1306.
- Guzman-Villanueva, D., El-Sherbiny, I.M., Herrera-Ruiz, D., Vlassov, A.V. i Smyth, H.D.C., 2012. Formulation approaches to short interfering RNA and MicroRNA: challenges and implications. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(11), s. 4046–4066.
- Han, S.-W., Nakamura, C., Kotobuki, N., Obataya, I., Ohgushi, H., Nagamune, T. i Miyake, J., 2008. High-efficiency DNA injection into a single human mesenchymal stem cell using a nanoneedle and atomic force microscopy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 4(3), s. 215–225.
- Harting, M.T., Jimenez, F. i Cox, C.S., 2009. Isolation of mesenchymal stem cells (MSCs) from green fluorescent protein positive (GFP+) transgenic rodents: the grass is not always green(er). *Stem Cells and Development*, 18(1), s. 127–135.
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S. i Jacobs, R., 2011. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell communication and signaling: CCS*, 9, s. 12.

- Hastings, J.W., 1996. Chemistries and colors of bioluminescent reactions: a review. *Gene*, 173(1 Spec No), s. 5–11.
- Haynesworth, S.E., Goshima, J., Goldberg, V.M. i Caplan, A.I., 1992. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*, 13(1), s. 81–88.
- Heiskanen, A., Hirvonen, T., Salo, H., Impola, U., Olonen, A., Laitinen, A., Tiitinen, S., Natunen, S., Aitio, O., Miller-Podraza, H., Wuhrer, M., Deelder, A.M., Natunen, J., Laine, J., Lehenkari, P., Saarinen, J., Satomaa, T. i Valmu, L., 2009. Glycomics of bone marrow-derived mesenchymal stem cells can be used to evaluate their cellular differentiation stage. *Glycoconjugate Journal*, 26(3), s. 367–384.
- Hensvold, A.H., Magnusson, P.K.E., Joshua, V., Hansson, M., Israelsson, L., Ferreira, R., Jakobsson, P.-J., Holmdahl, R., Hammarström, L., Malmström, V., Askling, J., Klareskog, L. i Catrina, A.I., 2015. Environmental and genetic factors in the development of anticitrullinated protein antibodies (ACPAs) and ACPA-positive rheumatoid arthritis: an epidemiological investigation in twins. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 74(2), s. 375–380.
- Heo, J.H., Han, S.W. i Lee, S.K., 2005. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radical Biology & Medicine*, 39(1), s. 51–70.
- Heo, J.S., Choi, Y., Kim, H.-S. i Kim, H.O., 2016. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *International Journal of Molecular Medicine*, 37(1), s. 115–125.
- Herter, J. i Zarbock, A., 2013. Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 190(9), s. 4451–4457.
- Hicks, A. i Jolkkonen, J., 2009. Challenges and possibilities of intravascular cell therapy in stroke. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 69(1), s. 1–11.
- Honma, T., Honmou, O., Iihoshi, S., Harada, K., Houkin, K., Hamada, H. i Kocsis, J.D., 2006. Intravenous infusion of immortalized human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in adult rat. *Experimental Neurology*, 199(1), s. 56–66.
- Honmou, O., Houkin, K., Matsunaga, T., Niitsu, Y., Ishiai, S., Onodera, R., Waxman, S.G. i Kocsis, J.D., 2011. Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke. *Brain: A Journal of Neurology*, 134(Pt 6), s. 1790–1807.
- Horita, Y., Honmou, O., Harada, K., Houkin, K., Hamada, H. i Kocsis, J.D., 2006. Intravenous administration of glial cell line-derived neurotrophic factor gene-modified human mesenchymal stem cells protects against injury in a cerebral ischemia model in the adult rat. *Journal of Neuroscience Research*, 84(7), s. 1495–1504.
- Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., Keating, A. i International Society for Cellular Therapy, 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5), s. 393–395.
- Huang, R., Vider, J., Serganova, I. i Blasberg, R.G., 2011. ATP-binding cassette transporters modulate both coelenterazine- and D-luciferin-based bioluminescence imaging. *Molecular Imaging*, 10(3), s. 215–226.
- Huang, Z.G., Xue, D., Preston, E., Karbalai, H. i Buchan, A.M., 1999. Biphasic opening of the blood-brain barrier following transient focal ischemia: effects of hypothermia. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 26(4), s. 298–304.
- Ip, J.E., Wu, Y., Huang, J., Zhang, L., Pratt, R.E. i Dzau, V.J., 2007. Mesenchymal stem cells use integrin beta1 not CXC chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment. *Molecular Biology of the Cell*, 18(8), s. 2873–2882.
- Isern, J., García-García, A., Martín, A.M., Arranz, L., Martín-Pérez, D., Torroja, C., Sánchez-Cabo, F. i Méndez-Ferrer, S., 2014. The neural crest is a source of mesenchymal stem cells with specialized hematopoietic stem cell niche function. *eLife*, 3, s. e03696.

- Ishibashi, H., Hirao, K., Yamaguchi, J. i Nabekura, J., 2009. Inhibition of chloride outward transport by gadolinium in cultured rat spinal cord neurons. *Neurotoxicology*, 30(1), s. 155–159.
- Jablonska, A., Shea, D.J., Cao, S., Bulte, J.W., Janowski, M., Konstantopoulos, K. i Walczak, P., 2018. Overexpression of VLA-4 in glial-restricted precursors enhances their endothelial docking and induces diapedesis in a mouse stroke model. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 38(5), s. 835–846.
- Janowski, M., Bulte, J.W.M., Handa, J.T., Rini, D. i Walczak, P., 2015. Concise Review: Using Stem Cells to Prevent the Progression of Myopia-A Concept. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 33(7), s. 2104–2113.
- Janowski, M., Gornicka-Pawlak, E., Kozłowska, H., Domanska-Janik, K., Gielecki, J. i Lukomska, B., 2008. Structural and functional characteristic of a model for deep-seated lacunar infarct in rats. *Journal of the Neurological Sciences*, 273(1–2), s. 40–48.
- Janowski, M., Lukomska, B. i Domanska-Janik, K., 2011. Migratory capabilities of human umbilical cord blood-derived neural stem cells (HUCB-NSC) in vitro. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 71(1), s. 24–35.
- Janowski, M., Lyczek, A., Engels, C., Xu, J., Lukomska, B., Bulte, J.W.M. i Walczak, P., 2013. Cell size and velocity of injection are major determinants of the safety of intracarotid stem cell transplantation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 33(6), s. 921–927.
- Janowski, M., Walczak, P. i Date, I., 2010. Intravenous route of cell delivery for treatment of neurological disorders: a meta-analysis of preclinical results. *Stem Cells and Development*, 19(1), s. 5–16.
- Janowski, M., Walczak, P., Kropiwnicki, T., Jurkiewicz, E., Domanska-Janik, K., Bulte, J.W.M., Lukomska, B. i Roszkowski, M., 2014. Long-term MRI cell tracking after intraventricular delivery in a patient with global cerebral ischemia and prospects for magnetic navigation of stem cells within the CSF. *PLoS One*, 9(2), s. e97631.
- Jeon, G.S., Im, W., Shim, Y.-M., Lee, M., Kim, M.-J., Hong, Y.-H., Seong, S.-Y., Kim, M. i Sung, J.-J., 2016. Neuroprotective Effect of Human Adipose Stem Cell-Derived Extract in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurochemical Research*, 41(4), s. 913–923.
- Ji, F., Duan, H.-G., Zheng, C.-Q. i Li, J., 2015. Comparison of chloromethyl-dialkylcarbocyanine and green fluorescent protein for labeling human umbilical mesenchymal stem cells. *Biotechnology Letters*, 37(2), s. 437–447.
- Jiang, X.-X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S.-X., Wu, Y., Yu, X.-D. i Mao, N., 2005. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 105(10), s. 4120–4126.
- Julius, D., 2009. David Julius, Editor, for the Annual Review of Physiology Editorial Committee. *Annual Review of Physiology*, [online] 71(1). Dostępne: <<https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.ph.71.022409.100001>> [dostęp 3.08.2018].
- Jung, J.W., Kwon, M., Choi, J.C., Shin, J.W., Park, I.W., Choi, B.W. i Kim, J.Y., 2013. Familial occurrence of pulmonary embolism after intravenous, adipose tissue-derived stem cell therapy. *Yonsei Medical Journal*, 54(5), s. 1293–1296.
- Kang, J.M., Yeon, B.K., Cho, S.-J. i Suh, Y.-H., 2016. Stem Cell Therapy for Alzheimer's Disease: A Review of Recent Clinical Trials. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 54(3), s. 879–889.
- Kang, S.-G., Shinojima, N., Hossain, A., Gumin, J., Yong, R.L., Colman, H., Marini, F., Andreeff, M. i Lang, F.F., 2010. Isolation and perivascular localization of mesenchymal stem cells from mouse brain. *Neurosurgery*, 67(3), s. 711–720.
- Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R. i Weinberg, R.A., 2007. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*, 449(7162), s. 557–563.

- Karussis, D., Karageorgiou, C., Vaknin-Dembinsky, A., Gowda-Kurkalli, B., Gomori, J.M., Kassis, I., Bulte, J.W.M., Petrou, P., Ben-Hur, T., Abramsky, O. i Slavin, S., 2010. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of Neurology*, 67(10), s. 1187–1194.
- Kassis, I., Zangi, L., Rivkin, R., Levdansky, L., Samuel, S., Marx, G. i Gorodetsky, R., 2006. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplantation*, 37(10), s. 967–976.
- Katz, A.J., Tholpady, A., Tholpady, S.S., Shang, H. i Ogle, R.C., 2005. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 23(3), s. 412–423.
- Kawamori, Y., Matsui, O., Kadoya, M., Yoshikawa, J., Demachi, H. i Takashima, T., 1992. Differentiation of hepatocellular carcinomas from hyperplastic nodules induced in rat liver with ferrite-enhanced MR imaging. *Radiology*, 183(1), s. 65–72.
- Kean, T.J., Lin, P., Caplan, A.I. i Dennis, J.E., 2013. MSCs: Delivery Routes and Engraftment, Cell-Targeting Strategies, and Immune Modulation. *Stem Cells International*, 2013, s. 732742.
- Keimpema, E., Fokkens, M.R., Nagy, Z., Agoston, V., Luiten, P.G.M., Nyakas, C., Boddeke, H.W.G.M. i Copray, J.C.V.M., 2009. Early transient presence of implanted bone marrow stem cells reduces lesion size after cerebral ischaemia in adult rats. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 35(1), s. 89–102.
- Khabbal, J., Kerkelä, E., Mitkari, B., Raki, M., Nystedt, J., Mikkonen, V., Bergström, K., Laitinen, S., Korhonen, M. i Jolkkonen, J., 2015. Differential Clearance of Rat and Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells From the Brain After Intra-arterial Infusion in Rats. *Cell Transplantation*, 24(5), s. 819–828.
- Kim, J.E., Kalimuthu, S. i Ahn, B.-C., 2015. In vivo cell tracking with bioluminescence imaging. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 49(1), s. 3–10.
- Kim, K.S., Lee, H.J., An, J., Kim, Y.B., Ra, J.C., Lim, I. i Kim, S.U., 2014. Transplantation of human adipose tissue-derived stem cells delays clinical onset and prolongs life span in ALS mouse model. *Cell Transplantation*, 23(12), s. 1585–1597.
- Kim, M.H., Woo, S.-K., Lee, K.C., An, G.I., Pandya, D., Park, N.W., Nahm, S.-S., Eom, K.D., Kim, K.I., Lee, T.S., Kim, C.W., Kang, J.H., Yoo, J. i Lee, Y.J., 2015. Longitudinal monitoring adipose-derived stem cell survival by PET imaging hexadecyl-4-¹²⁴I-iodobenzoate in rat myocardial infarction model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 456(1), s. 13–19.
- Kim, S., Chang, K.-A., Kim, J. a, Park, H.-G., Ra, J.C., Kim, H.-S. i Suh, Y.-H., 2012. The preventive and therapeutic effects of intravenous human adipose-derived stem cells in Alzheimer's disease mice. *PLoS One*, 7(9), s. e45757.
- Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M.S., Shou, M., Lee, C.W., Barr, S., Fuchs, S. i Epstein, S.E., 2004. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*, 109(12), s. 1543–1549.
- Knaän-Shanzer, S., van de Watering, M.J.M., van der Velde, I., Gonçalves, M.A.F.V., Valerio, D. i de Vries, A.A.F., 2005. Endowing human adenovirus serotype 5 vectors with fiber domains of species B greatly enhances gene transfer into human mesenchymal stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 23(10), s. 1598–1607.
- Ko, I.K., Kean, T.J. i Dennis, J.E., 2009. Targeting mesenchymal stem cells to activated endothelial cells. *Biomaterials*, 30(22), s. 3702–3710.
- Ko, I.K., Kim, B.-G., Awadallah, A., Mikulan, J., Lin, P., Letterio, J.J. i Dennis, J.E., 2010. Targeting improves MSC treatment of inflammatory bowel disease. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(7), s. 1365–1372.
- Kolecka, M.A., Arnhold, S., Schmidt, M., Reich, C., Kramer, M., Failing, K. i von Pückler, K., 2017. Behaviour of adipose-derived canine mesenchymal stem cells after superparamagnetic iron oxide nanoparticles labelling for magnetic resonance imaging. *BMC veterinary research*, 13(1), s. 62.

- Komatsu, K., Honmou, O., Suzuki, J., Houkin, K., Hamada, H. i Kocsis, J.D., 2010. Therapeutic time window of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after cerebral ischemia. *Brain Research*, 1334, s. 84–92.
- Koniusz, S., Andrzejewska, A., Muraca, M., Srivastava, A.K., Janowski, M. i Lukomska, B., 2016. Extracellular Vesicles in Physiology, Pathology, and Therapy of the Immune and Central Nervous System, with Focus on Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells as Therapeutic Tools. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10, s. 109.
- Kouris, N.A., Schaefer, J.A., Hatta, M., Freeman, B.T., Kamp, T.J., Kawaoka, Y. i Ogle, B.M., 2012. Directed Fusion of Mesenchymal Stem Cells with Cardiomyocytes via VSV-G Facilitates Stem Cell Programming. *Stem Cells International*, 2012, s. 414038.
- Krampera, M., Galipeau, J., Shi, Y., Tarte, K., Sensebe, L. i MSC Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT), 2013. Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy*, 15(9), s. 1054–1061.
- Krstić, J., Obradović, H., Jauković, A., Okić-Đorđević, I., Trivanović, D., Kukulj, T., Mojsilović, S., Ilić, V., Santibañez, J.F. i Bugarski, D., 2015. Urokinase type plasminogen activator mediates Interleukin-17-induced peripheral blood mesenchymal stem cell motility and transendothelial migration. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1853(2), s. 431–444.
- Kuçi, Z., Seiberth, J., Latifi-Pupovci, H., Wehner, S., Stein, S., Grez, M., Bönig, H., Köhl, U., Klingebiel, T., Bader, P. i Kuçi, S., 2013. Clonal analysis of multipotent stromal cells derived from CD271+ bone marrow mononuclear cells: functional heterogeneity and different mechanisms of allosuppression. *Haematologica*, 98(10), s. 1609–1616.
- Kuhbier, J.W., Weyand, B., Radtke, C., Vogt, P.M., Kasper, C. i Reimers, K., 2010. Isolation, characterization, differentiation, and application of adipose-derived stem cells. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 123, s. 55–105.
- Kumar, A., Prasad, M., Jali, V.P., Pandit, A.K., Misra, S., Kumar, P., Chakravarty, K., Kathuria, P. i Gulati, A., 2017. Bone marrow mononuclear cell therapy in ischaemic stroke: a systematic review. *Acta Neurologica Scandinavica*, 135(5), s. 496–506.
- Kumar, S. i Ponnazhagan, S., 2007. Bone homing of mesenchymal stem cells by ectopic alpha 4 integrin expression. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(14), s. 3917–3927.
- Kunz, A. i Iadecola, C., 2009. Cerebral vascular dysregulation in the ischemic brain. *Handbook of Clinical Neurology*, 92, s. 283–305.
- Kupcova Skalnikova, H., 2013. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie*, 95(12), s. 2196–2211.
- Landázuri, N., Tong, S., Suo, J., Joseph, G., Weiss, D., Sutcliffe, D.J., Giddens, D.P., Bao, G. i Taylor, W.R., 2013. Magnetic targeting of human mesenchymal stem cells with internalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)*, 9(23), s. 4017–4026.
- Langer, H.F., Stellos, K., Steingen, C., Frohofer, A., Schönberger, T., Krämer, B., Bigalke, B., May, A.E., Seizer, P., Müller, I., Gieseke, F., Siegel-Axel, D., Meuth, S.G., Schmidt, A., Wendel, H.P., Müller, I., Bloch, W. i Gawaz, M., 2009. Platelet derived bFGF mediates vascular integrative mechanisms of mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47(2), s. 315–325.
- Larocca, T.F., Macêdo, C.T., Souza, B.S. de F., Andrade-Souza, Y.M., Villarreal, C.F., Matos, A.C., Silva, D.N., da Silva, K.N., de Souza, C.L.E.M., Paixão, D. da S., Bezerra, M. da R., Alves, R.L., Soares, M.B.P. i Dos Santos, R.R., 2017. Image-guided percutaneous intralesional administration of mesenchymal stromal cells in subjects with chronic complete spinal cord injury: a pilot study. *Cytotherapy*, 19(10), s. 1189–1196.
- Lassailly, F., Griessinger, E. i Bonnet, D., 2010. „Microenvironmental contaminations” induced by fluorescent lipophilic dyes used for noninvasive in vitro and in vivo cell tracking. *Blood*, 115(26), s. 5347–5354.

- Last'ovicka, J., Budinský, V., Spísek, R. i Bartůnková, J., 2009. Assessment of lymphocyte proliferation: CFSE kills dividing cells and modulates expression of activation markers. *Cellular Immunology*, 256(1–2), s. 79–85.
- Lee, J.K., Jin, H.K., Endo, S., Schuchman, E.H., Carter, J.E. i Bae, J.-S., 2010a. Intracerebral transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduces amyloid-beta deposition and rescues memory deficits in Alzheimer's disease mice by modulation of immune responses. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 28(2), s. 329–343.
- Lee, J.S., Hong, J.M., Moon, G.J., Lee, P.H., Ahn, Y.H., Bang, O.Y. i STARTING collaborators, 2010b. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 28(6), s. 1099–1106.
- Lee, J.S., Yang, K., Cho, A.-N. i Cho, S.-W., 2018. Ferritin nanoparticles for improved self-renewal and differentiation of human neural stem cells. *Biomaterials Research*, 22, s. 5.
- Lee, K.-D., Kuo, T.K.-C., Whang-Peng, J., Chung, Y.-F., Lin, C.-T., Chou, S.-H., Chen, J.-R., Chen, Y.-P. i Lee, O.K.-S., 2004. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 40(6), s. 1275–1284.
- Lee, S.-T., Chu, K., Jung, K.-H., Im, W.-S., Park, J.-E., Lim, H.-C., Won, C.-H., Shin, S.-H., Lee, S.K., Kim, M. i Roh, J.-K., 2009. Slowed progression in models of Huntington disease by adipose stem cell transplantation. *Annals of Neurology*, 66(5), s. 671–681.
- Leibacher, J. i Henschler, R., 2016. Biodistribution, migration and homing of systemically applied mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 7, s. 7.
- Leng, L., Wang, Y., He, N., Wang, D., Zhao, Q., Feng, G., Su, W., Xu, Y., Han, Z., Kong, D., Cheng, Z., Xiang, R. i Li, Z., 2014. Molecular imaging for assessment of mesenchymal stem cells mediated breast cancer therapy. *Biomaterials*, 35(19), s. 5162–5170.
- Leroux, L., Descamps, B., Tojais, N.F., Séguy, B., Oses, P., Moreau, C., Daret, D., Ivanovic, Z., Boiron, J.-M., Lamazière, J.-M.D., Dufourcq, P., Couffignal, T. i Duplâa, C., 2010. Hypoxia preconditioned mesenchymal stem cells improve vascular and skeletal muscle fiber regeneration after ischemia through a Wnt4-dependent pathway. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(8), s. 1545–1552.
- Levy, O., Zhao, W., Mortensen, L.J., Leblanc, S., Tsang, K., Fu, M., Phillips, J.A., Sagar, V., Anandakumaran, P., Ngai, J., Cui, C.H., Eimon, P., Angel, M., Lin, C.P., Yanik, M.F. i Karp, J.M., 2013. mRNA-engineered mesenchymal stem cells for targeted delivery of interleukin-10 to sites of inflammation. *Blood*, 122(14), s. e23-32.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I. i Nourshargh, S., 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews. Immunology*, 7(9), s. 678–689.
- Li, B., Zhang, H., Zeng, M., He, W., Li, M., Huang, X., Deng, D.Y.B. i Wu, J., 2015a. Bone marrow mesenchymal stem cells protect alveolar macrophages from lipopolysaccharide-induced apoptosis partially by inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway. *Cell Biology International*, 39(2), s. 192–200.
- Li, J., Zhu, H., Liu, Y., Li, Q., Lu, S., Feng, M., Xu, Y., Huang, L., Ma, C., An, Y., Zhao, R.C., Wang, R. i Qin, C., 2010a. Human mesenchymal stem cell transplantation protects against cerebral ischemic injury and upregulates interleukin-10 expression in Macaca fascicularis. *Brain Research*, 1334, s. 65–72.
- Li, L., Jiang, Q., Ding, G., Zhang, L., Zhang, Z.G., Li, Q., Panda, S., Lu, M., Ewing, J.R. i Chopp, M., 2010b. Effects of administration route on migration and distribution of neural progenitor cells transplanted into rats with focal cerebral ischemia, an MRI study. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 30(3), s. 653–662.
- Li, L., Wu, S., Liu, Z., Zhuo, Z., Tan, K., Xia, H., Zhuo, Deng, X., Gao, Y. i Xu, Y., 2015b. Ultrasound-Targeted Microbubble Destruction Improves the Migration and Homing of Mesenchymal Stem Cells after Myocardial Infarction by Upregulating SDF-1/CXCR4: A Pilot Study. *Stem Cells International*, 2015, s. 691310.

- Li, Y., Chen, J., Wang, L., Lu, M. i Chopp, M., 2001. Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology*, 56(12), s. 1666–1672.
- Li, Y., Feng, L., Zhang, G.-X. i Ma, C., 2015c. Intranasal delivery of stem cells as therapy for central nervous system disease. *Experimental and Molecular Pathology*, 98(2), s. 145–151.
- Li, Y., Yu, X., Lin, S., Li, X., Zhang, S. i Song, Y.-H., 2007. Insulin-like growth factor 1 enhances the migratory capacity of mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356(3), s. 780–784.
- Li, Y.-H., Yu, J.-Z., Liu, C.-Y., Zhang, H., Zhang, H.-F., Yang, W.-F., Li, J.-L., Feng, Q.-J., Feng, L., Zhang, G.-X., Xiao, B.-G. i Ma, C.-G., 2014. Intranasal delivery of FSD-C10, a novel Rho kinase inhibitor, exhibits therapeutic potential in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunology*, 143(2), s. 219–229.
- Lim, J.Y., Park, S.H., Jeong, C.H., Oh, J.H., Kim, S.M., Ryu, C.H., Park, S.A., Ahn, J.G., Oh, W., Jeun, S.-S. i Chang, J.W., 2010. Microporation is a valuable transfection method for efficient gene delivery into human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *BMC biotechnology*, 10, s. 38.
- Lin, M.-N., Shang, D.-S., Sun, W., Li, B., Xu, X., Fang, W.-G., Zhao, W.-D., Cao, L. i Chen, Y.-H., 2013. Involvement of PI3K and ROCK signaling pathways in migration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells through human brain microvascular endothelial cell monolayers. *Brain Research*, 1513, s. 1–8.
- Ling, W., Zhang, J., Yuan, Z., Ren, G., Zhang, L., Chen, X., Rabson, A.B., Roberts, A.I., Wang, Y. i Shi, Y., 2014. Mesenchymal stem cells useIDO to regulate immunity in tumor microenvironment. *Cancer Research*, 74(5), s. 1576–1587.
- Liu, H., Xue, W., Ge, G., Luo, X., Li, Y., Xiang, H., Ding, X., Tian, P. i Tian, X., 2010a. Hypoxic preconditioning advances CXCR4 and CXCR7 expression by activating HIF-1 α in MSCs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 401(4), s. 509–515.
- Liu, H.-L., Hua, M.-Y., Chen, P.-Y., Chu, P.-C., Pan, C.-H., Yang, H.-W., Huang, C.-Y., Wang, J.-J., Yen, T.-C. i Wei, K.-C., 2010b. Blood-brain barrier disruption with focused ultrasound enhances delivery of chemotherapeutic drugs for glioblastoma treatment. *Radiology*, 255(2), s. 415–425.
- Livak, K.J. i Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), s. 402–408.
- Llufríu, S., Sepúlveda, M., Blanco, Y., Marín, P., Moreno, B., Berenguer, J., Gabilondo, I., Martínez-Heras, E., Sola-Valls, N., Arnaiz, J.-A., Andreu, E.J., Fernández, B., Bullich, S., Sánchez-Dalmau, B., Graus, F., Villoslada, P. i Saiz, A., 2014. Randomized placebo-controlled phase II trial of autologous mesenchymal stem cells in multiple sclerosis. *PLoS One*, 9(12), s. e113936.
- Lo, C.Y., Antonopoulos, A., Dell, A., Haslam, S.M., Lee, T. i Neelamegham, S., 2013. The use of surface immobilization of P-selectin glycoprotein ligand-1 on mesenchymal stem cells to facilitate selectin mediated cell tethering and rolling. *Biomaterials*, 34(33), s. 8213–8222.
- Lowell, C.A. i Mayadas, T.N., 2012. Overview: studying integrins in vivo. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 757, s. 369–397.
- Luria, E.A., Panasyuk, A.F. i Friedenstein, A.Y., 1971. Fibroblast colony formation from monolayer cultures of blood cells. *Transfusion*, 11(6), s. 345–349.
- Macias, M.I., Grande, J., Moreno, A., Domínguez, I., Bornstein, R. i Flores, A.I., 2010. Isolation and characterization of true mesenchymal stem cells derived from human term decidua capable of multilineage differentiation into all 3 embryonic layers. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 203(5), s. 495.e9-495.e23.
- Mackay, A.M., Beck, S.C., Murphy, J.M., Barry, F.P., Chichester, C.O. i Pittenger, M.F., 1998. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Engineering*, 4(4), s. 415–428.

- Madeira, C., Mendes, R.D., Ribeiro, S.C., Boura, J.S., Aires-Barros, M.R., da Silva, C.L. i Cabral, J.M.S., 2010. Nonviral gene delivery to mesenchymal stem cells using cationic liposomes for gene and cell therapy. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, s. 735349.
- Maggini, J., Mirkin, G., Bognanni, I., Holmberg, J., Piazzón, I.M., Nepomnaschy, I., Costa, H., Cañones, C., Raiden, S., Vermeulen, M. i Geffner, J.R., 2010. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One*, 5(2), s. e9252.
- Majumdar, M.K., Keane-Moore, M., Buyaner, D., Hardy, W.B., Moorman, M.A., McIntosh, K.R. i Mosca, J.D., 2003. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Science*, 10(2), s. 228–241.
- Mäkelä, T., Takalo, R., Arvola, O., Haapanen, H., Yannopoulos, F., Blanco, R., Ahvenjärvi, L., Kiviluoma, K., Kerkelä, E., Nystedt, J., Juvonen, T. i Lehenkari, P., 2015. Safety and biodistribution study of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells and mononuclear cells and the impact of the administration route in an intact porcine model. *Cytotherapy*, 17(4), s. 392–402.
- Marongiu, F., Gramignoli, R., Sun, Q., Tahan, V., Miki, T., Dorko, K., Ellis, E. i Strom, S.C., 2010. Isolation of amniotic mesenchymal stem cells. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, Chapter 1, s. Unit 1E.5.
- Marquez-Curtis, L.A. i Janowska-Wieczorek, A., 2013. Enhancing the migration ability of mesenchymal stromal cells by targeting the SDF-1/CXCR4 axis. *BioMed Research International*, 2013, s. 561098.
- Mathiasen, A.B. i Kastrup, J., 2013. Non-invasive in-vivo imaging of stem cells after transplantation in cardiovascular tissue. *Theranostics*, 3(8), s. 561–572.
- McGinley, L., McMahon, J., Strappe, P., Barry, F., Murphy, M., O’Toole, D. i O’Brien, T., 2011. Lentiviral vector mediated modification of mesenchymal stem cells & enhanced survival in an in vitro model of ischaemia. *Stem Cell Research & Therapy*, 2(2), s. 12.
- Meisel, R., Brockers, S., Heseler, K., Degistirici, O., Bülle, H., Woite, C., Stuhlsatz, S., Schwippert, W., Jäger, M., Sorg, R., Henschler, R., Seissler, J., Dilloo, D. i Däubener, W., 2011. Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia*, 25(4), s. 648–654.
- Meng, X., Ichim, T.E., Zhong, J., Rogers, A., Yin, Z., Jackson, J., Wang, H., Ge, W., Bogin, V., Chan, K.W., Thébaud, B. i Riordan, N.H., 2007. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *Journal of Translational Medicine*, 5, s. 57.
- Mets, T. i Verdonk, G., 1981. In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, 16(1), s. 81–89.
- Mezey, É. i Nemeth, K., 2015. Mesenchymal stem cells and infectious diseases: Smarter than drugs. *Immunology Letters*, 168(2), s. 208–214.
- Miao, Z., Jin, J., Chen, L., Zhu, J., Huang, W., Zhao, J., Qian, H. i Zhang, X., 2006. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biology International*, 30(9), s. 681–687.
- Mitkari, B., Kerkelä, E., Nystedt, J., Korhonen, M., Mikkonen, V., Huhtala, T. i Jolkkonen, J., 2013. Intra-arterial infusion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells results in transient localization in the brain after cerebral ischemia in rats. *Experimental Neurology*, 239, s. 158–162.
- Moll, G., Jitschin, R., von Bahr, L., Rasmusson-Duprez, I., Sundberg, B., Lönnies, L., Elgue, G., Nilsson-Ekdahl, K., Mougiakakos, D., Lambris, J.D., Ringdén, O., Le Blanc, K. i Nilsson, B., 2011. Mesenchymal stromal cells engage complement and complement receptor bearing innate effector cells to modulate immune responses. *PLoS One*, 6(7), s. e21703.
- Mougiakakos, D., Jitschin, R., Johansson, C.C., Okita, R., Kiessling, R. i Le Blanc, K., 2011. The impact of inflammatory licensing on heme oxygenase-1-mediated induction of regulatory T cells by human mesenchymal stem cells. *Blood*, 117(18), s. 4826–4835.
- Munir, H., Rainger, G.E., Nash, G.B. i McGettrick, H., 2015. Analyzing the effects of stromal cells on the recruitment of leukocytes from flow. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (95), s. e52480.

- Muraglia, A., Cancedda, R. i Quarto, R., 2000. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal of Cell Science*, 113 (Pt 7), s. 1161–1166.
- Muschler, G.F., Nakamoto, C. i Griffith, L.G., 2004. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 86-A(7), s. 1541–1558.
- Naghdi, M., Tiraihi, T., Namin, S.A.M. i Arabkheradmand, J., 2009. Transdifferentiation of bone marrow stromal cells into cholinergic neuronal phenotype: a potential source for cell therapy in spinal cord injury. *Cytotherapy*, 11(2), s. 137–152.
- Nagyova, M., Slovinska, L., Blasko, J., Grulova, I., Kuricova, M., Cigankova, V., Harvanova, D. i Cizkova, D., 2014. A comparative study of PKH67, Dil, and BrdU labeling techniques for tracing rat mesenchymal stem cells. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 50(7), s. 656–663.
- Nakashima, S., Matsuyama, Y., Nitta, A., Sakai, Y. i Ishiguro, N., 2005. Highly efficient transfection of human marrow stromal cells by nucleofection. *Transplantation Proceedings*, 37(5), s. 2290–2292.
- Nasef, A., Chapel, A., Mazurier, C., Bouchet, S., Lopez, M., Mathieu, N., Sensebé, L., Zhang, Y., Gorin, N.-C., Thierry, D. i Fouillard, L., 2007. Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. *Gene Expression*, 13(4–5), s. 217–226.
- Nauta, A.J., Kruisselbrink, A.B., Lurvink, E., Willemze, R. i Fibbe, W.E., 2006. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 177(4), s. 2080–2087.
- Nishihira, S., Okubo, N., Takahashi, N., Ishisaki, A., Sugiyama, Y. i Chosa, N., 2011. High-cell density-induced VCAM1 expression inhibits the migratory ability of mesenchymal stem cells. *Cell Biology International*, 35(5), s. 475–481.
- Nowakowski, A., Andrzejewska, A., Boltze, J., Nitzsche, F., Cui, L.-L., Jolkkonen, J., Walczak, P., Lukomska, B. i Janowski, M., 2017. Translation, but not transfection limits clinically relevant, exogenous mRNA based induction of alpha-4 integrin expression on human mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*, 7(1), s. 1103.
- Nowakowski, A., Andrzejewska, A., Janowski, M., Walczak, P. i Lukomska, B., 2013. Genetic engineering of stem cells for enhanced therapy. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 73(1), s. 1–18.
- Oh, S.H., Kim, H.N., Park, H.-J., Shin, J.Y. i Lee, P.H., 2015. Mesenchymal Stem Cells Increase Hippocampal Neurogenesis and Neuronal Differentiation by Enhancing the Wnt Signaling Pathway in an Alzheimer's Disease Model. *Cell Transplantation*, 24(6), s. 1097–1109.
- Oh, W., Kim, D.-S., Yang, Y.S. i Lee, J.K., 2008. Immunological properties of umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells. *Cellular Immunology*, 251(2), s. 116–123.
- Okamoto, T., Aoyama, T., Nakayama, T., Nakamata, T., Hosaka, T., Nishijo, K., Nakamura, T., Kiyono, T. i Toguchida, J., 2002. Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 295(2), s. 354–361.
- Onda, T., Honmou, O., Harada, K., Houkin, K., Hamada, H. i Kocsis, J.D., 2008. Therapeutic benefits by human mesenchymal stem cells (hMSCs) and Ang-1 gene-modified hMSCs after cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28(2), s. 329–340.
- Orciani, M., Mariggiò, M.A., Morabito, C., Di Benedetto, G. i Di Primio, R., 2010. Functional characterization of calcium-signaling pathways of human skin-derived mesenchymal stem cells. *Skin Pharmacology and Physiology*, 23(3), s. 124–132.
- Otani, K., Yamahara, K., Ohnishi, S., Obata, H., Kitamura, S. i Nagaya, N., 2009. Nonviral delivery of siRNA into mesenchymal stem cells by a combination of ultrasound and microbubbles. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 133(2), s. 146–153.
- Park, J.S., Suryaprakash, S., Lao, Y.-H. i Leong, K.W., 2015. Engineering mesenchymal stem cells for regenerative medicine and drug delivery. *Methods (San Diego, Calif.)*, 84, s. 3–16.

- Park, S. i Na, K., 2012. The transfection efficiency of photosensitizer-induced gene delivery to human MSCs and internalization rates of EGFP and Runx2 genes. *Biomaterials*, 33(27), s. 6485–6494.
- Park, S.A., Ryu, C.H., Kim, S.M., Lim, J.Y., Park, S.I., Jeong, C.H., Jun, J.A., Oh, J.H., Park, S.H., Oh, W. i Jeun, S.-S., 2011. CXCR4-transfected human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells exhibit enhanced migratory capacity toward gliomas. *International Journal of Oncology*, 38(1), s. 97–103.
- Pasha, Z., Wang, Y., Sheikh, R., Zhang, D., Zhao, T. i Ashraf, M., 2008. Preconditioning enhances cell survival and differentiation of stem cells during transplantation in infarcted myocardium. *Cardiovascular Research*, 77(1), s. 134–142.
- Patel, S.A., Meyer, J.R., Greco, S.J., Corcoran, K.E., Bryan, M. i Rameshwar, P., 2010. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(10), s. 5885–5894.
- Patki, S., Kadam, S., Chandra, V. i Bhonde, R., 2010. Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. *Human Cell*, 23(2), s. 35–40.
- Paul, G., Özen, I., Christophersen, N.S., Reinbothe, T., Bengzon, J., Visse, E., Jansson, K., Dannaeus, K., Henriques-Oliveira, C., Roybon, L., Anisimov, S.V., Renström, E., Svensson, M., Haegerstrand, A. i Brundin, P., 2012. The adult human brain harbors multipotent perivascular mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 7(4), s. e35577.
- Pavlova, G., Lopatina, T., Kalinina, N., Rybalkina, E., Parfyonova, Y., Tkachuk, V. i Revishchin, A., 2012. In vitro neuronal induction of adipose-derived stem cells and their fate after transplantation into injured mouse brain. *Current Medicinal Chemistry*, 19(30), s. 5170–5177.
- Pendharkar, A.V., Chua, J.Y., Andres, R.H., Wang, N., Gaeta, X., Wang, H., De, A., Choi, R., Chen, S., Rutt, B.K., Gambhir, S.S. i Guzman, R., 2010. Biodistribution of neural stem cells after intravascular therapy for hypoxic-ischemia. *Stroke*, 41(9), s. 2064–2070.
- Phadnis, S.M., Joglekar, M.V., Dalvi, M.P., Muthyala, S., Nair, P.D., Ghaskadbi, S.M., Bhonde, R.R. i Hardikar, A.A., 2011. Human bone marrow-derived mesenchymal cells differentiate and mature into endocrine pancreatic lineage in vivo. *Cytotherapy*, 13(3), s. 279–293.
- Phinney, D.G., Kopen, G., Righter, W., Webster, S., Tremain, N. i Prockop, D.J., 1999. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 75(3), s. 424–436.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S. i Marshak, D.R., 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5411), s. 143–147.
- Poloni, A., Rosini, V., Mondini, E., Maurizi, G., Mancini, S., Discepoli, G., Biasio, S., Battaglini, G., Berardinelli, E., Serrani, F. i Leoni, P., 2008. Characterization and expansion of mesenchymal progenitor cells from first-trimester chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy*, 10(7), s. 690–697.
- Polzer, H., Volkmer, E., Saller, M.M., Prall, W.C., Haasters, F., Drosse, I., Anz, D., Mutschler, W. i Schieker, M., 2012. Long-term detection of fluorescently labeled human mesenchymal stem cell in vitro and in vivo by semi-automated microscopy. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 18(2), s. 156–165.
- Ponomaryov, T., Peled, A., Petit, I., Taichman, R.S., Habler, L., Sandbank, J., Arenzana-Seisdedos, F., Magerus, A., Caruz, A., Fujii, N., Nagler, A., Lahav, M., Szyper-Kravitz, M., Zipori, D. i Lapidot, T., 2000. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(11), s. 1331–1339.
- Ponte, A.L., Marais, E., Gally, N., Langonné, A., Delorme, B., Héroult, O., Charbord, P. i Domenech, J., 2007. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(7), s. 1737–1745.
- Prohazka, F., Dallman, M.J. i Lo Celso, C., 2013. From seeing to believing: labelling strategies for in vivo cell-tracking experiments. *Interface Focus*, 3(3), s. 20130001.

- Qin, C., Lan, X., He, J., Xia, X., Tian, Y., Pei, Z., Yuan, H. i Zhang, Y., 2013. An in vitro and in vivo evaluation of a reporter gene/probe system hERL/(18)F-FES. *PLoS One*, 8(4), s. e61911.
- Ramadan, A.-R., Denny, M.C., Vahidy, F., Yamal, J.-M., Wu, T.-C., Sarraj, A., Savitz, S. i Grotta, J., 2017. Agreement Among Stroke Faculty and Fellows in Treating Ischemic Stroke Patients With Tissue-Type Plasminogen Activator and Thrombectomy. *Stroke*, 48(1), s. 222–224.
- Randazzo, P.A. i Hirsch, D.S., 2004. Arf GAPs: multifunctional proteins that regulate membrane traffic and actin remodelling. *Cellular Signalling*, 16(4), s. 401–413.
- Rejman, J., Tavernier, G., Bavarsad, N., Demeester, J. i De Smedt, S.C., 2010. mRNA transfection of cervical carcinoma and mesenchymal stem cells mediated by cationic carriers. *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 147(3), s. 385–391.
- Remington, S.J., 2011. Green fluorescent protein: a perspective. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 20(9), s. 1509–1519.
- Ren, Z., Wang, J., Wang, S., Zou, C., Li, X., Guan, Y., Chen, Z. i Zhang, Y.A., 2013. Autologous transplantation of GDNF-expressing mesenchymal stem cells protects against MPTP-induced damage in cynomolgus monkeys. *Scientific Reports*, 3, s. 2786.
- Ribeiro, S., Mairhofer, J., Madeira, C., Diogo, M.M., Lobato da Silva, C., Monteiro, G., Grabherr, R. i Cabral, J.M., 2012. Plasmid DNA size does affect nonviral gene delivery efficiency in stem cells. *Cellular Reprogramming*, 14(2), s. 130–137.
- Rice, B.W., Cable, M.D. i Nelson, M.B., 2001. In vivo imaging of light-emitting probes. *Journal of Biomedical Optics*, 6(4), s. 432–440.
- Riegler, J., Liew, A., Hynes, S.O., Ortega, D., O'Brien, T., Day, R.M., Richards, T., Sharif, F., Pankhurst, Q.A. i Lythgoe, M.F., 2013. Superparamagnetic iron oxide nanoparticle targeting of MSCs in vascular injury. *Biomaterials*, 34(8), s. 1987–1994.
- Ries, C., Egea, V., Karow, M., Kolb, H., Jochum, M. i Neth, P., 2007. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood*, 109(9), s. 4055–4063.
- Riese, S.B., Buscher, K., Enders, S., Kuehne, C., Tauber, R. i Dervedde, J., 2016. Structural requirements of mono- and multivalent L-selectin blocking aptamers for enhanced receptor inhibition in vitro and in vivo. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12(4), s. 901–908.
- Roeder, E., Henrionnet, C., Goebel, J.C., Gambier, N., Beuf, O., Grenier, D., Chen, B., Vuissoz, P.-A., Gillet, P. i Pinzano, A., 2014. Dose-response of superparamagnetic iron oxide labeling on mesenchymal stem cells chondrogenic differentiation: a multi-scale in vitro study. *PLoS One*, 9(5), s. e98451.
- Rosen, E.D. i MacDougald, O.A., 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 7(12), s. 885–896.
- Rossignol, J., Boyer, C., Lévêque, X., Fink, K.D., Thinard, R., Blanchard, F., Dunbar, G.L. i Lescaudron, L., 2011. Mesenchymal stem cell transplantation and DMEM administration in a 3NP rat model of Huntington's disease: morphological and behavioral outcomes. *Behavioural Brain Research*, 217(2), s. 369–378.
- Rosu-Myles, M., McCully, J., Fair, J., Mehic, J., Menendez, P., Rodriguez, R. i Westwood, C., 2013. The globoseries glycosphingolipid SSEA-4 is a marker of bone marrow-derived clonal multipotent stromal cells in vitro and in vivo. *Stem Cells and Development*, 22(9), s. 1387–1397.
- Roubelakis, M.G., Pappa, K.I., Bitsika, V., Zagoura, D., Vlahou, A., Papadaki, H.A., Antsaklis, A. i Anagnou, N.P., 2007. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 16(6), s. 931–952.
- Rushkevich, Y.N., Kosmacheva, S.M., Zabrodets, G.V., Ignatenko, S.I., Goncharova, N.V., Severin, I.N., Likhachev, S.A. i Potapnev, M.P., 2015. The Use of Autologous Mesenchymal Stem Cells for Cell Therapy

of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis in Belarus. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 159(4), s. 576–581.

- Russell, K.C., Phinney, D.G., Lacey, M.R., Barrilleaux, B.L., Meyertholen, K.E. i O'Connor, K.C., 2010. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 28(4), s. 788–798.
- Ruster, B., Göttig, S., Ludwig, R.J., Bistran, R., Müller, S., Seifried, E., Gille, J. i Henschler, R., 2006. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*, 108(12), s. 3938–3944.
- Ryser, M.F., Ugarte, F., Thieme, S., Bornhäuser, M., Roesen-Wolff, A. i Brenner, S., 2008. mRNA transfection of CXCR4-GFP fusion--simply generated by PCR--results in efficient migration of primary human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 14(3), s. 179–184.
- Ryu, H.H., Lim, J.H., Byeon, Y.E., Park, J.R., Seo, M.S., Lee, Y.W., Kim, W.H., Kang, K.S. i Kweon, O.K., 2009. Functional recovery and neural differentiation after transplantation of allogenic adipose-derived stem cells in a canine model of acute spinal cord injury. *Journal of Veterinary Science*, 10(4), s. 273–284.
- Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P.G., Riminucci, M. i Bianco, P., 2007. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*, 131(2), s. 324–336.
- Sackstein, R., Merzaban, J.S., Cain, D.W., Dagia, N.M., Spencer, J.A., Lin, C.P. i Wohlgemuth, R., 2008. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nature Medicine*, 14(2), s. 181–187.
- Salama, M., Sobh, M., Emam, M., Abdalla, A., Sabry, D., El-Gamal, M., Lotfy, A., El-Husseiny, M., Sobh, M., Shalash, A. i Mohamed, W.M., 2017. Effect of intranasal stem cell administration on the nigrostriatal system in a mouse model of Parkinson's disease. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 13(3), s. 976–982.
- Sandoval, K.E. i Witt, K.A., 2008. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiology of Disease*, 32(2), s. 200–219.
- Sarkar, D., Vemula, P.K., Zhao, W., Gupta, A., Karnik, R. i Karp, J.M., 2010. Engineered mesenchymal stem cells with self-assembled vesicles for systemic cell targeting. *Biomaterials*, 31(19), s. 5266–5274.
- Schmidt, A., Ladage, D., Steingen, C., Brixius, K., Schinköthe, T., Klinz, F.-J., Schwinger, R.H.G., Mehlhorn, U. i Bloch, W., 2006. Mesenchymal stem cells transmigrate over the endothelial barrier. *European Journal of Cell Biology*, 85(11), s. 1179–1188.
- Schneider, S., Unger, M., van Griensven, M. i Balmayor, E.R., 2017. Adipose-derived mesenchymal stem cells from liposuction and resected fat are feasible sources for regenerative medicine. *European Journal of Medical Research*, 22(1), s. 17.
- Schnoor, M., Alcaide, P., Voisin, M.-B. i van Buul, J.D., 2015. Crossing the Vascular Wall: Common and Unique Mechanisms Exploited by Different Leukocyte Subsets during Extravasation. *Mediators of Inflammation*, 2015, s. 946509.
- Schofield, R., 1978. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 4(1–2), s. 7–25.
- Schrobback, K., Wrobel, J., Hutmacher, D.W., Woodfield, T.B.F. i Klein, T.J., 2013. Stage-specific embryonic antigen-4 is not a marker for chondrogenic and osteogenic potential in cultured chondrocytes and mesenchymal progenitor cells. *Tissue Engineering. Part A*, 19(11–12), s. 1316–1326.
- Schu, S., Nosov, M., O'Flynn, L., Shaw, G., Treacy, O., Barry, F., Murphy, M., O'Brien, T. i Ritter, T., 2012. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(9), s. 2094–2103.
- Schwerk, A., Altschüler, J., Roch, M., Gossen, M., Winter, C., Berg, J., Kurtz, A. i Steiner, B., 2015. Human adipose-derived mesenchymal stromal cells increase endogenous neurogenesis in the rat subventricular zone acutely after 6-hydroxydopamine lesioning. *Cytotherapy*, 17(2), s. 199–214.

- Shen, J., Duan, X.-H., Cheng, L.-N., Zhong, X.-M., Guo, R.-M., Zhang, F., Zhou, C.-P. i Liang, B.-L., 2010. In vivo MR imaging tracking of transplanted mesenchymal stem cells in a rabbit model of acute peripheral nerve traction injury. *Journal of magnetic resonance imaging: JMRI*, 32(5), s. 1076–1085.
- Shen, L.H., Li, Y., Chen, J., Zhang, J., Vanguri, P., Borneman, J. i Chopp, M., 2006. Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increases axon-myelin remodeling after stroke. *Neuroscience*, 137(2), s. 393–399.
- Shi, H., Zhang, Y., Zhang, G., Guo, J., Zhang, X., Song, H., Lv, J., Gao, J., Wang, Y., Chen, L. i Wang, Y., 2013. Systematic functional comparative analysis of four single-stranded DNA-binding proteins and their affection on viral RNA metabolism. *PLoS One*, 8(1), s. e55076.
- Shi, M., Li, J., Liao, L., Chen, B., Li, B., Chen, L., Jia, H. i Zhao, R.C., 2007. Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica*, 92(7), s. 897–904.
- da Silva Meirelles, L., Malta, T.M., de Deus Wagatsuma, V.M., Palma, P.V.B., Araújo, A.G., Ribeiro Malmegrim, K.C., Morato de Oliveira, F., Panepucci, R.A., Silva, W.A., Kashima Haddad, S. i Covas, D.T., 2015. Cultured Human Adipose Tissue Pericytes and Mesenchymal Stromal Cells Display a Very Similar Gene Expression Profile. *Stem Cells and Development*, 24(23), s. 2822–2840.
- Simmons, P.J. i Torok-Storb, B., 1991. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*, 78(1), s. 55–62.
- Sloboda, D.D. i Brooks, S.V., 2016. Treatment with selectin blocking antibodies after lengthening contractions of mouse muscle blunts neutrophil accumulation but does not reduce damage. *Physiological Reports*, 4(1).
- Smith, H., Whittall, C., Weksler, B. i Middleton, J., 2012. Chemokines stimulate bidirectional migration of human mesenchymal stem cells across bone marrow endothelial cells. *Stem Cells and Development*, 21(3), s. 476–486.
- Song, H., Chang, W., Lim, S., Seo, H.-S., Shim, C.Y., Park, S., Yoo, K.-J., Kim, B.-S., Min, B.-H., Lee, H., Jang, Y., Chung, N. i Hwang, K.-C., 2007. Tissue transglutaminase is essential for integrin-mediated survival of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(6), s. 1431–1438.
- de Souza, L.E.B., Malta, T.M., Kashima Haddad, S. i Covas, D.T., 2016. Mesenchymal Stem Cells and Pericytes: To What Extent Are They Related? *Stem Cells and Development*, 25(24), s. 1843–1852.
- Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M.C. i Moretta, L., 2008. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*, 111(3), s. 1327–1333.
- Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M.C. i Moretta, L., 2006. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*, 107(4), s. 1484–1490.
- Steingen, C., Brenig, F., Baumgartner, L., Schmidt, J., Schmidt, A. i Bloch, W., 2008a. Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 44(6), s. 1072–1084.
- Stepinski, J., Waddell, C., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E. i Rhoads, R.E., 2001. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel „anti-reverse” cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'-deoxy)GpppG. *RNA (New York, N.Y.)*, 7(10), s. 1486–1495.
- Su, W.-R., Zhang, Q.-Z., Shi, S.-H., Nguyen, A.L. i Le, A.D., 2011. Human gingiva-derived mesenchymal stromal cells attenuate contact hypersensitivity via prostaglandin E2-dependent mechanisms. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 29(11), s. 1849–1860.
- Syková, E., Rychmach, P., Drahorádová, I., Konrádová, Š., Růžičková, K., Voříšek, I., Forostyak, S., Homola, A. i Bojar, M., 2017. Transplantation of Mesenchymal Stromal Cells in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase I/IIa Clinical Trial. *Cell Transplantation*, 26(4), s. 647–658.

- Tachibana, Y., Enmi, J., Agudelo, C.A., Iida, H. i Yamaoka, T., 2014. Long-term/bioinert labeling of rat mesenchymal stem cells with PVA-Gd conjugates and MRI monitoring of the labeled cell survival after intramuscular transplantation. *Bioconjugate Chemistry*, 25(7), s. 1243–1251.
- Takashima, Y., Era, T., Nakao, K., Kondo, S., Kasuga, M., Smith, A.G. i Nishikawa, S.-I., 2007. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell*, 129(7), s. 1377–1388.
- Tang, G., Liu, Y., Zhang, Z., Lu, Y., Wang, Y., Huang, J., Li, Y., Chen, X., Gu, X., Wang, Y. i Yang, G.-Y., 2014. Mesenchymal stem cells maintain blood-brain barrier integrity by inhibiting aquaporin-4 upregulation after cerebral ischemia. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 32(12), s. 3150–3162.
- Tang, Y.L., Zhao, Q., Qin, X., Shen, L., Cheng, L., Ge, J. i Phillips, M.I., 2005. Paracrine action enhances the effects of autologous mesenchymal stem cell transplantation on vascular regeneration in rat model of myocardial infarction. *The Annals of Thoracic Surgery*, 80(1), s. 229–236; discussion 236–237.
- Tarulli, E., Chaudhuri, J.D., Gretka, V., Hoyles, A., Morshead, C.M. i Stanisiz, G.J., 2013. Effectiveness of micron-sized superparamagnetic iron oxide particles as markers for detection of migration of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in a stroke model. *Journal of magnetic resonance imaging: JMRI*, 37(6), s. 1409–1418.
- Teo, G.S.L., Ankrum, J.A., Martinelli, R., Boetto, S.E., Simms, K., Sciuto, T.E., Dvorak, A.M., Karp, J.M. i Carman, C.V., 2012. Mesenchymal stem cells transmigrate between and directly through tumor necrosis factor- α -activated endothelial cells via both leukocyte-like and novel mechanisms. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 30(11), s. 2472–2486.
- Terashima, Y., Onai, N., Murai, M., Enomoto, M., Poonpiriya, V., Hamada, T., Motomura, K., Suwa, M., Ezaki, T., Haga, T., Kanegasaki, S. i Matsushima, K., 2005. Pivotal function for cytoplasmic protein FROUNT in CCR2-mediated monocyte chemotaxis. *Nature Immunology*, 6(8), s. 827–835.
- Toma, C., Wagner, W.R., Bowry, S., Schwartz, A. i Villanueva, F., 2009. Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observations of cell kinetics. *Circulation Research*, 104(3), s. 398–402.
- Tu, Z., Li, Q., Bu, H. i Lin, F., 2010. Mesenchymal stem cells inhibit complement activation by secreting factor H. *Stem Cells and Development*, 19(11), s. 1803–1809.
- Uchida, S., Kataoka, K. i Itaka, K., 2015. Screening of mRNA Chemical Modification to Maximize Protein Expression with Reduced Immunogenicity. *Pharmaceutics*, 7(3), s. 137–151.
- Ungerer, C., Quade-Lyssa, P., Radeke, H.H., Henschler, R., Königs, C., Köhl, U., Seifried, E. i Schüttrumpf, J., 2014. Galectin-9 is a suppressor of T and B cells and predicts the immune modulatory potential of mesenchymal stromal cell preparations. *Stem Cells and Development*, 23(7), s. 755–766.
- Urbani, S., Caporale, R., Lombardini, L., Bosi, A. i Saccardi, R., 2006. Use of CFDA-SE for evaluating the in vitro proliferation pattern of human mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 8(3), s. 243–253.
- Vaegler, M., Maerz, J.K., Amend, B., da Silva, L.A., Mannheim, J.G., Fuchs, K., Will, S., Sievert, K.D., Stenzl, A., Hart, M.L. i Aicher, W.K., 2014. Labelling and tracking of human mesenchymal stromal cells in preclinical studies and large animal models of degenerative diseases. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 9(5), s. 444–450.
- Van Itallie, C.M. i Anderson, J.M., 2014. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 36, s. 157–165.
- Vaquero, J., Zurita, M., Rico, M.A., Bonilla, C., Aguayo, C., Fernández, C., Tapiador, N., Sevilla, M., Morejón, C., Montilla, J., Martínez, F., Marín, E., Bustamante, Rodríguez, A., Martínez, P., García, C., Ovejero, M., Fernández, M.V. i Neurological Cell Therapy Group, 2017. Repeated subarachnoid administrations of autologous mesenchymal stromal cells supported in autologous plasma improve quality of life in patients suffering incomplete spinal cord injury. *Cytotherapy*, 19(3), s. 349–359.
- Venkataramana, N.K., Kumar, S.K.V., Balaraju, S., Radhakrishnan, R.C., Bansal, A., Dixit, A., Rao, D.K., Das, M., Jan, M., Gupta, P.K. i Totey, S.M., 2010. Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 155(2), s. 62–70.

- Vizoso, F.J., Eiro, N., Cid, S., Schneider, J. i Perez-Fernandez, R., 2017. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9).
- Vu, Q., Xie, K., Eckert, M., Zhao, W. i Cramer, S.C., 2014. Meta-analysis of preclinical studies of mesenchymal stromal cells for ischemic stroke. *Neurology*, 82(14), s. 1277–1286.
- Walczak, P., Wojtkiewicz, J., Nowakowski, A., Habich, A., Holak, P., Xu, J., Adamiak, Z., Chehade, M., Pearl, M.S., Gailloud, P., Lukomska, B., Maksymowicz, W., Bulte, J.W. i Janowski, M., 2017. Real-time MRI for precise and predictable intra-arterial stem cell delivery to the central nervous system. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 37(7), s. 2346–2358.
- Walczak, P., Zhang, J., Gilad, A.A., Kedziorek, D.A., Ruiz-Cabello, J., Young, R.G., Pittenger, M.F., van Zijl, P.C.M., Huang, J. i Bulte, J.W.M., 2008. Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia. *Stroke*, 39(5), s. 1569–1574.
- Wang, L., Deng, J., Wang, J., Xiang, B., Yang, T., Gruwel, M., Kashour, T., Tomanek, B., Summer, R., Freed, D., Jassal, D.S., Dai, G., Glogowski, M., Deslauriers, R., Arora, R.C. i Tian, G., 2009. Superparamagnetic iron oxide does not affect the viability and function of adipose-derived stem cells, and superparamagnetic iron oxide-enhanced magnetic resonance imaging identifies viable cells. *Magnetic Resonance Imaging*, 27(1), s. 108–119.
- von Wedel-Parlow, M., Schrot, S., Lemmen, J., Treeratanapiboon, L., Wegener, J. i Galla, H.-J., 2011. Neutrophils cross the BBB primarily on transcellular pathways: an in vitro study. *Brain Research*, 1367, s. 62–76.
- Wei, L., Fraser, J.L., Lu, Z.-Y., Hu, X. i Yu, S.P., 2012. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhances angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Neurobiology of Disease*, 46(3), s. 635–645.
- Wei, N., Yu, S.P., Gu, X., Taylor, T.M., Song, D., Liu, X.-F. i Wei, L., 2013. Delayed intranasal delivery of hypoxic-preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhanced cell homing and therapeutic benefits after ischemic stroke in mice. *Cell Transplantation*, 22(6), s. 977–991.
- Weissleder, R., 2001. A clearer vision for in vivo imaging. *Nature Biotechnology*, 19(4), s. 316–317.
- Whitfield, M.J., Lee, W.C.J. i Van Vliet, K.J., 2013. Onset of heterogeneity in culture-expanded bone marrow stromal cells. *Stem Cell Research*, 11(3), s. 1365–1377.
- Wiehe, J.M., Kaya, Z., Homann, J.M., Wöhrle, J., Vogt, K., Nguyen, T., Rottbauer, W., Torzewski, J., Fekete, N., Rojewski, M., Schrezenmeier, H., Moepps, B. i Zimmermann, O., 2013. GMP-adapted overexpression of CXCR4 in human mesenchymal stem cells for cardiac repair. *International Journal of Cardiology*, 167(5), s. 2073–2081.
- Winkler, E.A., Bell, R.D. i Zlokovic, B.V., 2011. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nature Neuroscience*, 14(11), s. 1398–1405.
- Xiao, Q., Wang, S., Tian, H., Xin, L., Zou, Z., Hu, Y., Chang, C., Wang, X., Yin, Q., Zhang, X. i Wang, L., 2012. TNF- α increases bone marrow mesenchymal stem cell migration to ischemic tissues. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 62(3), s. 409–414.
- Xiao, Y.-D., Paudel, R., Liu, J., Ma, C., Zhang, Z.-S. i Zhou, S.-K., 2016. MRI contrast agents: Classification and application (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 38(5), s. 1319–1326.
- Xu, W., Zhang, X., Qian, H., Zhu, W., Sun, X., Hu, J., Zhou, H. i Chen, Y., 2004. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 229(7), s. 623–631.
- Yamada, M., Gurney, P.T., Chung, J., Kundu, P., Drukker, M., Smith, A.K., Weissman, I.L., Nishimura, D., Robbins, R.C. i Yang, P.C., 2009. Manganese-guided cellular MRI of human embryonic stem cell and human bone marrow stromal cell viability. *Magnetic Resonance in Medicine*, 62(4), s. 1047–1054.

- Yamamoto, M., 1985. Pathology of experimental pulmonary bone marrow embolism. I. Initial lesions of the rabbit lung after intravenous infusion of allogeneic bone marrow with special reference to its pathogenesis. *Acta Pathologica Japonica*, 35(1), s. 45–69.
- Yan, Y., Ma, T., Gong, K., Ao, Q., Zhang, X. i Gong, Y., 2014. Adipose-derived mesenchymal stem cell transplantation promotes adult neurogenesis in the brains of Alzheimer's disease mice. *Neural Regeneration Research*, 9(8), s. 798–805.
- Yañez, R., Lamana, M.L., García-Castro, J., Colmenero, I., Ramírez, M. i Bueren, J.A., 2006. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 24(11), s. 2582–2591.
- Yang, B., Strong, R., Sharma, S., Brenneman, M., Mallikarjunarao, K., Xi, X., Grotta, J.C., Aronowski, J. i Savitz, S.I., 2011. Therapeutic time window and dose response of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic stroke. *Journal of Neuroscience Research*, 89(6), s. 833–839.
- Yang, Y. i Rosenberg, G.A., 2011. MMP-mediated disruption of claudin-5 in the blood-brain barrier of rat brain after cerebral ischemia. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 762, s. 333–345.
- Yavagal, D.R., Lin, B., Raval, A.P., Garza, P.S., Dong, C., Zhao, W., Rangel, E.B., McNiece, I., Rundek, T., Sacco, R.L., Perez-Pinzon, M. i Hare, J.M., 2014. Efficacy and dose-dependent safety of intra-arterial delivery of mesenchymal stem cells in a rodent stroke model. *PLoS One*, 9(5), s. e93735.
- Yoo, J.U., Barthel, T.S., Nishimura, K., Solchaga, L., Caplan, A.I., Goldberg, V.M. i Johnstone, B., 1998. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 80(12), s. 1745–1757.
- Yousif, L.F., Di Russo, J. i Sorokin, L., 2013. Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes. *Cell Adhesion & Migration*, 7(1), s. 101–110.
- Yu, Q., Liu, L., Lin, J., Wang, Y., Xuan, X., Guo, Y. i Hu, S., 2015. SDF-1 α /CXCR4 Axis Mediates The Migration of Mesenchymal Stem Cells to The Hypoxic-Ischemic Brain Lesion in A Rat Model. *Cell Journal*, 16(4), s. 440–447.
- Yu, X., Lu, C., Liu, H., Rao, S., Cai, J., Liu, S., Kriegel, A.J., Greene, A.S., Liang, M. i Ding, X., 2013. Hypoxic preconditioning with cobalt of bone marrow mesenchymal stem cells improves cell migration and enhances therapy for treatment of ischemic acute kidney injury. *PLoS One*, 8(5), s. e62703.
- Zanotti, L., Angioni, R., Cali, B., Soldani, C., Ploia, C., Moalli, F., Garghesa, M., D'Amico, G., Elliman, S., Tedeschi, G., Maffioli, E., Negri, A., Zacchigna, S., Sarukhan, A., Stein, J.V. i Viola, A., 2016. Mouse mesenchymal stem cells inhibit high endothelial cell activation and lymphocyte homing to lymph nodes by releasing TIMP-1. *Leukemia*, 30(5), s. 1143–1154.
- Zappia, E., Casazza, S., Pedemonte, E., Benvenuto, F., Bonanni, I., Gerdoni, E., Giunti, D., Ceravolo, A., Cazzanti, F., Frassoni, F., Mancardi, G. i Uccelli, A., 2005. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*, 106(5), s. 1755–1761.
- Zeddou, M., Briquet, A., Relic, B., Josse, C., Malaise, M.G., Gothot, A., Lechanteur, C. i Beguin, Y., 2010. The umbilical cord matrix is a better source of mesenchymal stem cells (MSC) than the umbilical cord blood. *Cell Biology International*, 34(7), s. 693–701.
- Zhao, Z., Watt, C., Karystinou, A., Roelofs, A.J., McCaig, C.D., Gibson, I.R. i De Bari, C., 2011. Directed migration of human bone marrow mesenchymal stem cells in a physiological direct current electric field. *European Cells & Materials*, 22, s. 344–358.
- Zhou, S., Greenberger, J.S., Epperly, M.W., Goff, J.P., Adler, C., Leboff, M.S. i Glowacki, J., 2008. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell*, 7(3), s. 335–343.
- Zhou, Z., Chen, Y., Zhang, H., Min, S., Yu, B., He, B. i Jin, A., 2013. Comparison of mesenchymal stromal cells from human bone marrow and adipose tissue for the treatment of spinal cord injury. *Cytotherapy*, 15(4), s. 434–448.

- Zimmerlin, L., Donnenberg, V.S., Pfeifer, M.E., Meyer, E.M., Péault, B., Rubin, J.P. i Donnenberg, A.D., 2010. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 77(1), s. 22–30.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P. i Hedrick, M.H., 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), s. 4279–4295.
- Zwijnenburg, P.J., van der Poll, T., Florquin, S., van Deventer, S.J., Roord, J.J. i van Furth, A.M., 2001. Experimental pneumococcal meningitis in mice: a model of intranasal infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(7), s. 1143–1146.