

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

ZAKŁAD NEUROBIOLOGII NAPRAWCZEJ

Anna Jabłońska

Transplantacja ludzkich progenitorów neuralnych  
krwi pępowinowej do mózgu szczura po uszkodzeniu ouabainą:  
wzajemne oddziaływanie komórek dawcy i biorcy

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem  
Prof. dr hab. Barbary Łukomskiej

WARSZAWA 2013

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

- **Jablonska A.**, Janowski M, Lukomska B. Different Methods of Immunosuppression do not prolong the survival of human umbilical cord blood derived neural stem cells transplanted into focal brain injured rats. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 2013:73(1) (zaakceptowana do druku)  
*IF=2.110*
- Janowski M and **Jablonska A.**, Kozłowska H, Orukari I, Bernard S, Bulte JW, Lukomska B, Walczak P: Neonatal desensitization does not universally prevent xenograft rejection". *Nature Methods* 2012:9:856-858 (**I i II autor są równoważni**)  
*IF=19.276*
- Jurga M, Dainiak M, Sarnowska A, **Jablonska A.**, Tripathi A, Plieva FM, Savin I, Strojek L, Jungvid H, Kumar A, Lukomska B, Domanska-Janik K, Forraz N, McGuckin C: New bioactive cryogel scaffolds for in vitro neural tissue engineering and in vivo transplantation. *Biomaterials* 2011:32:3423-3434  
*IF=7.365*
- **Jablonska A.**, Lukomska B: Stroke induced brain changes: implications for stem cell transplantation. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 2011:71(1):74-85  
*IF=2.110*
- **Jablonska A.**, Kozłowska H, Domanska-Janik K, Lukomska B: Transplantation of neural stem cells derived from human cord blood to the brain of adult and neonatal rats. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 2010:70(4):337-350  
*IF=1.533*

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

- MNiSW nr 2 P01 A 5430
- MNiSW nr 0142/B/P01/2008/35
- Foundation Jerome Lejeune (France)

Jestem z tych, którzy wierzą, że Nauka jest czymś bardzo pięknym.

- Maria Skłodowska-Curie

*Dziękuję Pani **Prof. dr hab. Barbarze Łukomskiej** za umożliwienie mi wykonania pracy w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej oraz za opiekę merytoryczną, przekazanie mi swojej wiedzy i doświadczeń, okazaną mi pomoc oraz nieocenioną wyrozumiałość i cierpliwość.*

*Dziękuję mojej Rodzinie, w szczególności Mamie, za wiarę we mnie  
oraz ogromne wsparcie.*

*Dziękuję również przyjaciołom, ludziom ważnym w moim życiu, za  
rozumienie oraz nieopisaną cierpliwość.*

*Podziękowania również dla moich Kolegów i Koleżanek oraz wszystkich  
pracowników Zakładu Neurobiologii Naprawczej za pomoc oraz za stworzenie  
atmosfery, która sprawia, że każdy dzień pracy jest przyjemnością.*

## SPIS TREŚCI

<b>SPIS TREŚCI .....</b>	<b>5</b>
<b>WYKAZ SKRÓTÓW.....</b>	<b>8</b>
<b>1. PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA.....</b>	<b>11</b>
1.1. Udar mózgu .....	11
1.1.1. Epidemiologia udaru mózgu .....	11
1.1.2. Patofizjologia udaru mózgu.....	12
1.2. Reakcje immunologiczne towarzyszące ischemii mózgu.....	13
1.2.1. Komórki immunologicznie czynne w mózgu.....	14
1.2.2. Reakcje zapalne towarzyszące udarowi mózgu z udziałem komórek immunologicznie czynnych krwiopochodnych.....	16
1.2.3. Mediatorzy zapalenia towarzyszące udarowi mózgu.....	18
1.3. Endogenne procesy naprawcze po ischemii mózgu.....	20
1.3.1. Proces neurogenyzy po ischemii mózgu .....	21
1.3.2. Czynniki neurotroficzne w procesach regeneracji OUN po ischemii mózgu .....	22
1.3.3. Proces angiogenezy po ischemii mózgu.....	27
1.4. Próby terapii udaru mózgu .....	28
1.4.1. Terapia farmakologiczna .....	28
1.4.2. Terapia z udziałem czynników neurotroficznych.....	30
1.5. Terapia udaru mózgu z zastosowaniem przeszczepu komórek .....	32
1.5.1. Rodzaje i źródła komórek macierzystych stosowanych w terapii udaru mózgu.....	32
1.5.2. Próby kliniczne przeszczepiania komórek u pacjentów po uszkodzeniu mózgu ....	37
<b>2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY .....</b>	<b>40</b>
<b>3. MATERIAŁ.....</b>	<b>42</b>
3.1. Neuralne komórki macierzyste ludzkiej krwi pępowinowej.....	42
3.2. Zwierzęta doświadczalne .....	42
3.3. Grupy badawcze .....	43
<b>4. METODY BADAŃ .....</b>	<b>44</b>
4.1. Hodowla komórek HUCB-NSC ustalonej linii .....	44
4.2. Znakowanie HUCB-NSC barwnikiem fluorescencyjnym CMFDA .....	44
4.3. Przygotowanie trójwymiarowych (3D) agregatów HUCB-NSC na nośnikach polimerowych .....	44
4.4. Eksperymentalny model uszkodzenia mózgu .....	45
4.5. Metody immunosupresji szczurów-biorców przeszczepu komórek HUCB-NSC.....	45
4.6. Pre-immunizacja nowonarodzonych osesków szczurów komórkami HUCB-NSC w celu wywołania tolerancji u dorosłych biorców przeszczepu .....	46
4.7. Transplantacja komórek HUCB-NSC znakowanych CMFDA do mózgu szczura...46	
4.8. Transplantacja 3D agregatów komórek HUCB-NSC znakowanych CMFDA umieszczonych na szkieletach żelatynowych, do mózgu szczura .....	46
4.9. Badanie proliferacji endogennych progenitorów neuralnych w mózgu szczura ....46	
4.10. Pobieranie materiału do badań.....	47
4.11. Analiza immunohistochemiczna .....	47
4.12. Wizualizacja mikroskopowa .....	48
4.13. Oznaczanie aktywności metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 w mózgu szczurów.....48	
4.14. Analiza ekspresji genów.....	48

4.15.	Analiza statystyczna .....	49
<b>5.</b>	<b>WYNIKI BADAŃ .....</b>	<b>53</b>
5.1.	Charakterystyka komórek linii HUCB-NSC w hodowli <i>in vitro</i> .....	53
5.2.	Wyniki badań <i>in vivo</i> po transplantacji HUCB-NSC do mózgu zdrowych szczurów 54	
5.2.1.	Identyfikacja HUCB-NSC w mózgu zdrowych szczurów – biorców przeszczepu ...	54
5.2.2.	Odpowiedź immunologiczna w mózgu szczurów po przeszczepie HUCB-NSC.....	56
5.3.	Transplantacja HUCB-NSC do mózgu szczurów po uszkodzeniu prądkowia ouabainą .....	58
5.3.1.	Identyfikacja HUCB-NSC przeszczepionych do mózgu szczurów po uszkodzeniu prądkowia ouabainą.....	58
5.3.2.	Odpowiedź immunologiczna w mózgu szczura po uszkodzeniu prądkowia ouabainą i po przeszczepie komórek HUCB-NSC.....	60
5.4.	Transplantacja HUCB-NSC do mózgu szczurów po uszkodzeniu ouabainą, poddanych immunosupresji cyklosporyną A (CsA).....	62
5.4.1.	Identyfikacja HUCB-NSC w mózgu szczurów – biorców przeszczepu po zastosowaniu immunosupresji CsA.....	62
5.4.2.	Odpowiedź immunologiczna w mózgu szczura po przeszczepie komórek HUCB- NSC u zwierząt poddanych immunosupresji CsA.....	63
5.5.	Transplantacja HUCB-NSC do mózgu szczurów po uszkodzeniu ouabainą poddanych trójskładnikowej immunosupresji (CsA+ Depo+Aza) .....	64
5.5.1.	Identyfikacja HUCB-NSC w mózgu szczurów – biorców przeszczepu po zastosowaniu immunosupresji (CsA+ Depo+Aza).....	64
5.5.2.	Odpowiedź immunologiczna w mózgu szczurów po uszkodzeniu prądkowia ouabainą i przeszczepie HUCB-NSC u zwierząt poddanych immunosupresji CsA+Depo+Aza .....	65
5.6.	Transplantacja HUCB-NSC do mózgu szczura po uszkodzeniu prądkowia ouabainą, poddanym zabiegowi pre-immunizacji biorców komórkami dawcy .....	66
5.6.1.	Identyfikacja HUCB-NSC w mózgu szczurów – biorców przeszczepu po zastosowaniu preimmunizacji zwierząt w okresie perinatalnym .....	66
5.6.2.	Odpowiedź immunologiczna na przeszczep komórek HUCB-NSC w mózgu szczurów poddanych wcześniej pre-immunizacji komórkami dawcy .....	67
5.7.	Charakterystyka <i>in vitro</i> HUCB-NSC hodowanych na szkieletach żelatynowych pokrytych lamininą przed ich przeszczepieniem do mózgu szczura .....	68
5.8.	Przeszczepianie HUCB-NSC w postaci trójwymiarowych (3D) agregatów komórkowych umieszczonych na szkieletach żelatynowych pokrytych lamininą do mózgu zdrowych szczurów .....	69
5.8.1.	Identyfikacja HUCB-NSC w mózgu zdrowego szczura po ich przeszczepie w postaci 3D agregatów na szkieletach G/L .....	69
5.8.2.	Odpowiedź immunologiczna w mózgu zdrowych szczurów-biorców po przeszczepie 3D struktur G/L zawierających HUCB-NSC .....	70
5.9.	Transplantacja HUCB-NSC w postaci trójwymiarowych (3D) agregatów komórkowych umieszczonych na szkieletach G/L do mózgu szczurów po uszkodzeniu prądkowia ouabainą.....	71
5.9.1.	Identyfikacja HUCB-NSC po ich przeszczepie w postaci 3D agregatów na szkieletach G/L w mózgu szczura po uszkodzeniu prądkowia ouabainą.....	71
5.9.2.	Odpowiedź immunologiczna w mózgu szczurów po uszkodzeniu prądkowia ouabainą na przeszczep 3D struktur G/L zawierających HUCB-NSC .....	72
5.10.	Analiza endogennej neurogenezy w mózgu szczurów po uszkodzeniu prądkowia ouabainą .....	73
5.10.1.	Ocena proliferacji endogennych progenitorów neuralnych w strefach neurogennych mózgu .....	73
5.10.2.	Identyfikacja nowopowstałych neuroblastów w strefach neurogennych mózgu szczurów po uszkodzeniu prądkowia ouabainą .....	74

---

5.10.3.	Aktywność metaloproteinaz w strefach neurogennych mózgu szczurów po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą.....	76
5.11.	Analiza endogennej neurogenezy w mózgu szczurów, którym przeszczepiono HUCB-NSC po wcześniejszym uszkodzeniu prążkowiec ouabainą .....	77
5.11.1.	Ocena proliferacji endogennych progenitorów neuralnych w strefach SVZ i SGZ po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą i transplantacji HUCB-NSC.....	77
5.11.2.	Identyfikacja nowopowstałych neuroblastów w strefach neurogennych mózgu szczurów po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą i transplantacji HUCB-NSC.....	79
5.11.3.	Aktywność metaloproteinaz w mózgu szczurów, którym przeszczepiono HUCB-NSC po wcześniejszym uszkodzeniu prążkowiec ouabainą.....	81
5.12.	Obecność czynników neurotroficznych w mózgu szczurów poddanych zabiegowi uszkodzenia prążkowiec i transplantacji komórek HUCB-NSC.....	82
5.12.1.	Analiza endogennych czynników neurotroficznych w mózgu szczurów po uszkodzeniu mózgu ouabainą i transplantacji HUCB-NSC.....	82
5.12.2.	Analiza egzogennych czynników neurotroficznych pochodzenia ludzkiego w mózgu szczurów po uszkodzeniu mózgu ouabainą i transplantacji HUCB-NSC....	86
<b>6.</b>	<b>DYSKUSJA WYNIKÓW .....</b>	<b>89</b>
6.1.	Charakterystyka ludzkich komórek macierzystych po ich transplantacji do mózgu szczura.....	90
6.2.	Odpowiedź immunologiczna w mózgu szczura po przeszczepie ludzkich komórek 91	
6.3.	Stymulacja neurogenezy w mózgu szczura po transplantacji komórek egzogennych .....	97
6.4.	Analiza ekspresji czynników neurotroficznych w mózgu szczura po ischemii i transplantacji komórek.....	98
<b>7.</b>	<b>PODSUMOWANIE .....</b>	<b>102</b>
<b>8.</b>	<b>WNIOSKI .....</b>	<b>102</b>
<b>9.</b>	<b>SPIS PIŚMIENNICTWA .....</b>	<b>103</b>
	<b>STRESZCZENIE .....</b>	<b>131</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>134</b>

---

## WYKAZ SKRÓTÓW

<b>AAS</b>	– zestaw antybiotyków i preparatów przeciwgrzybiczych do hodowli komórek (ang. Antibiotic Antimycotic Solution)
<b>BDNF</b>	– neurotropowy czynnik wzrostu pochodzenia mózgowego (ang. brain-derived neurotrophic factor)
<b>bFGF</b>	– zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. basic fibroblast growth factor)
<b>BrdU</b>	– 5-bromo-2'-deoksyurydyna (ang. bromodeoxyuridine)
<b>CAM</b>	– białka adhezyjne (ang. cell adhesion molecules)
<b>CBF</b>	– mózgowy przepływ krwi (ang. cerebral blood flow)
<b>CD15</b>	– białko powierzchniowe występujące na neutrofilach (ang. cluster of differentiation antigen 15)
<b>CD34</b>	– białko powierzchniowe występujące na hematopoetycznych komórkach macierzystych (ang. Cell Determinant 34)
<b>CD45R</b>	– białko powierzchniowe występujące na limfocytach B (ang. cluster of differentiation antigen 45R)
<b>CD5</b>	– białko powierzchniowe występujące na limfocytach T (ang. cluster of differentiation antigen 5)
<b>CD68</b>	– białko powierzchniowe występujące na makrofagach/mikrogleju (ang. cluster of differentiation antigen 68)
<b>CDNF</b>	– mózgowy dopaminowy czynnik neurotroficzny (ang. cerebral dopamine neurotrophic factor)
<b>CINC</b>	– cytokina indukowana chemoatraktantem dla neutrofilii (ang. cytokine-induced neutrophil chemoattractant)
<b>CMFDA</b>	– fluorescencyjny znacznik komórkowy (ang. 5-ChloroMethyl-Fluorescein-DiAcetate)
<b>CNTF</b>	– rzęskowy czynnik neurotroficzny (ang. ciliary neurotrophic factor)
<b>CsA</b>	– cyklosporyna A
<b>CsA+Depo+Aza</b>	– cyklosporyna A+Depo-Medrol+Azatiopryna
<b>CSIF</b>	– czynnik hamujący syntezę cytokin (ang. cytokine synthesis inhibitory factor)
<b>CXCR-4</b>	– receptor dla chemokin z rodziny CXC (ang. CXC chemokine receptor type 4)
<b>DAMP</b>	– czynnik związany z uszkodzeniem tkanki (ang. damage-associated molecular patterns)
<b>DCX</b>	– białko specyficzne dla migrujących neuroblastów (ang. doublecortin)
<b>DG</b>	– zakręt zębaty hipokampa (łac. dentate gyrus)
<b>DMEM</b>	– pożywka hodowlana (ang. Dulbecco/Vogt Modified Eagle's Minimal Essential Medium)
<b>dNTP</b>	– deoksyrybonukleotydy (ang. deoxyribonucleotide)
<b>EAE</b>	– doświadczalne zapalenie mózgu i rdzenia (ang. experimental autoimmune encephalomyelitis)
<b>ECM</b>	– macierz zewnątrzkomórkowa (ang. extracellular matrix)
<b>EEG</b>	– elektroencefalografia (ang. electroencephalography)
<b>EGF</b>	– nabłonkowy czynnik wzrostu (ang. epidermal growth factor)
<b>EPO</b>	– erytropoetyna (ang. erythropoietin)
<b>ESC</b>	– embrionalne komórki macierzyste (ang. embryonic stem cells)
<b>ESS</b>	– Europejska skala udarowa (ang. European Stroke Scale)
<b>FADD</b>	– domena śmierci związana z Fas (ang. Fas associated death domain)
<b>FBS</b>	– bydlęca surowica płodowa (ang. Fetal Bovine Serum)
<b>FGF</b>	– czynnik wzrostu fibroblastów (ang. fibroblast growth factor)
<b>G-CSF</b>	– czynnik stymulacji wzrostu kolonii granulocytów (ang. granulocyte colony-stimulating factor)
<b>GDNF</b>	– czynnik wzrostu pochodzenia glejowego (ang. glial cell-derived neurotrophic factor)
<b>GFAP</b>	– glejowe kwaśne białko włóknkowe (ang. glial fibrillary acidic protein)



<b>GM-CSF</b>	– czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
<b>HGF</b>	– czynnik wzrostu hepatocytów (ang. hepatocyte growth factor)
<b>hGRP</b>	– ludzkie progenitory glejowe (ang. human glial restricted-progenitor cells)
<b>HIF-1</b>	- czynnik indukowany hipoksją (ang. hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ )
<b>HMGB-1</b>	- białko o dużej ruchliwości elektroforetycznej (ang. high mobility group box chromosomal protein – 1)
<b>HUCB-NSC</b>	– neuralne komórki macierzyste izolowane z krwi pępowinowej ( ang. Human Umbilical Cord Blood-derived Neural Stem Cell)
<b>ICAM</b>	– białka adhezji międzykomórkowej (ang. intercellular adhesion molecules)
<b>IGF1</b>	– insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (ang. insulin-like growth factor 1)
<b>IL</b>	– interleukina
<b>IMS</b>	– immunosupresja
<b>iPS</b>	– indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. induced pluripotent stem cell)
<b>ITS</b>	– suplement diety hodowlanej zawierający insulinę, transferynę i selenian (ang. Insulin, Transferin Selenium)
<b>Ki67</b>	– antygen Ki-67 - marker komórkowej proliferacji (ang. antigen Ki-67)
<b>LIF</b>	– czynnik hamujący białaczkę (ang. leukemia inhibitory factor)
<b>MANF</b>	- śródmózgowy czynnik neurotroficzny pochodzenia astrocytarnego (ang. mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor)
<b>MAP-2</b>	– białko stabilizujące mikrotubule (ang. microtubule associated protein 2)
<b>MCAO</b>	– zamknięcie tętnicy środkowej mózgu ( ang. middle cerebral artery occlusion)
<b>MCP-1</b>	- białko chemotaktyczne dla monocytów 1(ang. monocyte chemoattractant protein -1)
<b>MHC</b>	– białka zgodności tkankowej (ang. major histocompatibility complex)
<b>MMP</b>	– metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. matrix metalloproteinases)
<b>MSC</b>	– mezenchymalne komórki macierzyste (ang. mesenchymal stem cells)
<b>NB</b>	– żywka hodowlana do hodowli neuronów (ang. NeuroBasal)
<b>NCAM</b>	– białka adhezji neuronów (ang. neural adhesion molecules)
<b>NF-200</b>	– białko neurofilamentów o masie molekularnej 200kDa (ang. 200 kDa Neurofilament protein)
<b>NGF</b>	– czynnik wzrostu nerwów (ang. nerve growth factor)
<b>NIHSS</b>	– skala udarowa Narodowego Instytutu Zdrowia (ang. National Institute of Health Stroke Scale)
<b>NO</b>	– tlenek azotu (ang. nitric oxide)
<b>NOD/SCID</b>	– myszy transgeniczne z defektem immunologicznym (ang. Non-Obese Diabetic/Severely Combined Immuno Deficient mice)
<b>NPC</b>	– neuralne komórki progenitorowe (ang. neural progenitor cells)
<b>NSC</b>	– neuralne komórki macierzyste (ang. neural stem cells)
<b>NT</b>	- neurotrofina
<b>OUA</b>	–model cytotoksycznego uszkodzenia mózgu ouabainą
<b>OUN</b>	– ośrodkowy układ nerwowy
<b>PBS</b>	– buforowana sól fizjologiczna (ang. phosphate buffered saline)
<b>PCR</b>	– reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction)
<b>PEDF</b>	- czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego siatkówki (ang. pigment epithelium-derived factor)
<b>PFA</b>	– paraformaldehyd (ang. Paraformaldehyde)
<b>PSA-NCAM</b>	– białko charakterystyczne dla niedojrzałych, migrujących neuroblastów (ang. Polysialylated Neural Adhesion Molecule)
<b>RMS</b>	- donosowy strumień migracji (ang. rostral migratory stream)
<b>ROS</b>	– reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species)
<b>rtPA</b>	– rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu (ang. recombinant tissue plasminogen activator)
<b>S100<math>\beta</math></b>	– białko cytoplazmatyczne występujące w dojrzałych astrocytach (ang. S100 calcium binding protein B)

<b>SCID</b>	– ciężki złożony niedobór immunologiczny (ang. Severe Combined Immunodeficiency)
<b>SDF-1</b>	– czynnik dścieliska -1 (ang. stromal cell-derived factor 1)
<b>SGZ</b>	– strefa podziarnista zakrętu zębatego hipokampa (ang. subgranular zone)
<b>Sox-2</b>	– czynnik transkrypcyjny (ang. SRY (sex determining region Y) - box 2) charakterystyczny dla pluripotencjalnych komórek macierzystych
<b>SVZ</b>	– strefa okołokomorowa (ang. subventricular zone)
<b>TBE</b>	– bufor zawierający Tris, kwas boranowy oraz EDTA (ang. Tris/Borate/EDTA)
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	– transformujący czynnik wzrostu beta-1(ang. transforming growth factor beta-1)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	– czynnik martwicy nowotworu alfa (ang. tumor necrosis factor)
<b>TPO</b>	- trombopoetyna
<b>TUJ-1</b>	– białko mikrotubularne ( $\beta$ III tubulina) (ang. Class III $\beta$ -tubulin)
<b>UCB</b>	- komórki krwi pępowinowej (ang. umbilical cord blood cells)
<b>VCAM</b>	– białka adhezji naczyń (ang. vascular cell adhesion protein)
<b>VDCC</b>	– kanał wapniowy zależny od napięcia (ang. voltage-dependent calcium channels)
<b>VEGF</b>	– czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (ang. vascular endothelial growth factor)
<b>VSEL</b>	- bardzo małe komórki podobne do embrionalnych komórek macierzystych (ang. very small embryonic –like stem cells)

## 1. PRZEGLĄD PIŚMIENNICTWA

---

Niedokrwienie mózgu jest jednym z ważniejszych problemów klinicznych wśród chorób układu nerwowego. Występujący w następstwie niedokrwienia zespół objawów określany mianem udaru powoduje wysoki wskaźnik śmiertelności chorych, a trudności diagnostyczne i ograniczone możliwości terapii stwarzają istotne problemy społeczne. Odkrycie neuralnych komórek macierzystych w mózgu dorosłych osobników stworzyło możliwości repopulacji uszkodzonych w wyniku udaru struktur nerwowych poprzez zastosowanie transplantacji egzogennych komórek o właściwościach neurogennych.

### 1.1. Udar mózgu

---

#### 1.1.1. Epidemiologia udaru mózgu

---

Udar mózgu jest w krajach wysoko rozwiniętych trzecią pod względem częstości przyczyną śmierci, po chorobach serca i nowotworach (Xing i wsp., 2012). W Polsce, co roku, około 60 tysięcy osób przechodzi udar mózgu, który w 20-30% prowadzi do wczesnego zgonu, zaś u chorych, którzy przeżyją ostrą fazę udaru, powoduje ciężkie i długotrwałe inwalidztwo. W następstwie udaru większość pacjentów wykazuje stałe ograniczenie funkcji życiowych, wynikające z deficytów neurologicznych i wymaga opieki osób trzecich oraz ciągłej rehabilitacji.

Wśród udarów ponad 85% przypadków stanowią udary niedokrwienne, będące wynikiem zablokowania przepływu w jednej lub kilku tętnicach mózgowych przez skrzeplinę. Pozostałych 15% przypadków to udary krwotoczne, spowodowane krwotokiem wewnątrz struktur mózgu lub do przestrzeni podpajęczynówkowej (Sims i wsp., 2010). Zaburzenia w dopływie krwi do ośrodkowego układu nerwowego (OUN) powodują nagłą utratę funkcji mózgu. Brak dostatecznego dostarczania krwi do mózgu, spowodowany gwałtowną niedrożnością naczyń krwionośnych wywołuje spadek poziomu glukozy i tlenu (Muir i wsp., 2007; Espinoza-Rojo i wsp., 2010). Normalny mózgowy przepływ krwi (CBF) wynosi 50-60ml/100 g/min, natomiast jego redukcja poniżej 20ml/100g/min powoduje zanik aktywności elektrycznej mózgu, a przepływ krwi mniejszy niż 10ml/100g/min prowadzi do nieodwracalnego uszkodzenia neuronów (Jaffer i wsp., 2011). Z badań Saver'a wynika, iż na skutek udaru u ludzi ginie około 120 milionów neuronów i 830 bilionów połączeń synaptycznych (Saver; 2006). W następstwie udaru, oprócz neuronów uszkodzeniu ulegają także astrocyty, oligodendrocyty i komórki śródbłonna naczyń (Lindvall i Kokaia, 2010). W oparciu o badania doświadczalne oraz wyniki badań klinicznych dotyczących długości trwania niedokrwienia, określono czas 5 minut jako prowadzący do szybko narastających zaburzeń czynności układu nerwowego oraz w konsekwencji do nieodwracalnej utraty integralności strukturalnej mózgu.

Czynniki podwyższonego ryzyka wystąpienia udaru obejmują zarówno te, które nie mogą być modyfikowane takie jak: wiek, wcześniejsze epizody niedokrwienne, cukrzyca, miażdżyca oraz czynniki modyfikowalne, jak: nadciśnienie, wysoki cholesterol, palenie tytoniu czy stres (Feigin, 2005; Hankey i wsp., 2006). Czynniki te często występujące jednocześnie odpowiadają za 60-80% przyczyn występowania udaru we współczesnej populacji (Allen i wsp., 2008).

Udar mózgu prowadzi do zmian hemodynamicznych, biochemicznych i patofizjologicznych, będących pochodnymi szeregu ostrych, podostrych i przewlekłych procesów zachodzących w

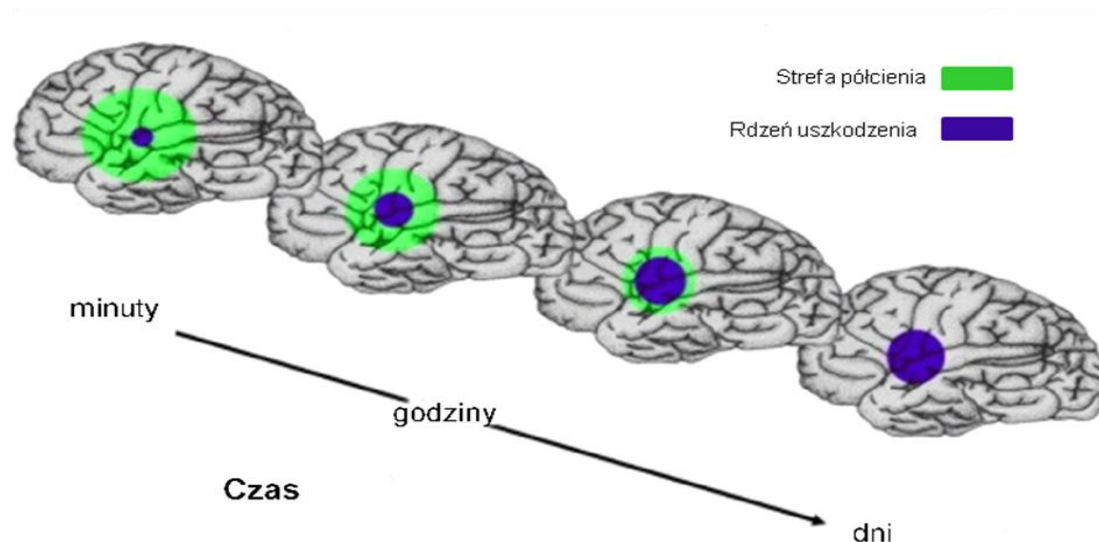
wyniku epizodu niedokrwienia i reperfuzji. Uszkodzenie komórek spowodowane jest deficytem energetycznym, zaburzeniem gospodarki jonowej, ekscytotoksycznością, pojawieniem się wolnych rodników i zmianą przepuszczalności bariery krew-mózg. Wolne rodniki, szczególnie reaktywne formy tlenu pojawiające się tuż po niedokrwieniu oraz cytokiny prozapalne, których aktywność wzrasta po reperfuzji, są odpowiedzialne za uszkodzenie tkanki nerwowej w późniejszej fazie schorzenia.

### 1.1.2. Patofizjologia udaru mózgu

Mózg jest narządem najbardziej wrażliwym na niedokrwienie (ischemię) z uwagi na szczególnie wysokie zapotrzebowanie energetyczne. Zatrzymanie dopływu krwi do mózgu przez 5-8 minut prowadzi do szybkiego narastania zaburzeń czynnościowych układu nerwowego i tak zwanej selektywnej śmierci neuronów. Stwierdzono, że niektóre okolice mózgu wykazują zwiększoną podatność na uszkodzenie wywołane przez globalną ischemię mózgu. Szczególnie wrażliwe na niedokrwienie są neurony piramidowe hipokampa w rejonie CA1, III i V warstwa kory mózgowej, komórki Purkinjego mózdzku oraz komórki prążkowiec. Wraz z rozwojem nieinwazyjnych technik obrazowania udowodniono, że pierwotny uraz wywołany niedotlenieniem mózgu, w miarę upływu czasu, obejmuje swym zasięgiem coraz to większe obszary tkanki nerwowej. Wydaje się jednak, iż nie jest to wynik dalszego niedotlenienia, ponieważ krążenie oboczne i spontaniczna tromboliza powodują poprawę ukrwienia uszkodzonych struktur mózgu (Arai i wsp. 1986; Pulsinelli i Duffy 1983). Późne uszkodzenia neuronów powstają prawdopodobnie w wyniku rozwoju wtórnych zaburzeń biochemicznych i molekularnych, indukowanych stresem niedokrwinnym. Upośledzony przebieg fizjologicznych procesów powstawania i przebiegu sygnałów wapniowych w warunkach nadmiernego pobudzenia neuronów, ich patologicznej depolaryzacji, deficytu energetycznego i stresu oksydacyjnego prowadzi do uszkodzenia a następnie do śmierci neuronów (Łazarewicz 2000).

Uszkodzenie tkanki nerwowej mózgu ma miejsce w dwóch etapach: fazie ostrej i podostrej. Podczas ostrej fazy zmiany w tkance są bezpośrednim wynikiem powodowanych przez niedotlenienie i brak glukozy zaburzeń energetycznych oraz wynikających z tego depolaryzacji błon komórkowych. Ma to miejsce, w ciągu pierwszych kilku minut po zatrzymaniu krążenia (Siesjo i wsp., 1992). W fazie podostrej następuje uwolnienie mediatorów zapalenia przez uszkodzone komórki mózgu, aktywacja mikrogleju i napływ krwiopochodnych komórek immunologicznie czynnych, co przyczynia się do progresji uszkodzenia (Emerich i wsp., 2002; Ladeby i wsp., 2005).

W przeciwieństwie do zmian biochemicznych i funkcjonalnych, które pojawiają się bardzo szybko po zmniejszeniu krążenia, zmiany morfologiczne w komórkach mózgu są widoczne znacznie później. Opitz oraz Schneider (1950) jako pierwsi opisali, że uszkodzenie mózgu powstające w wyniku redukcji ilości dostarczanego tlenu ma przebieg dwuetapowy. Początkowo upośledzona zostaje funkcjonalna aktywność mózgu, dopiero w następstwie dalszego niedotlenienia dochodzi do zahamowania metabolicznej aktywności niezbędnej do utrzymania struktury tkanki. Koncepcję dwustopniowego uszkodzenia mózgu potwierdzili Symon i wsp. (1977) wykorzystując w swoich badaniach model ogniskowego niedotlenienia mózgu.

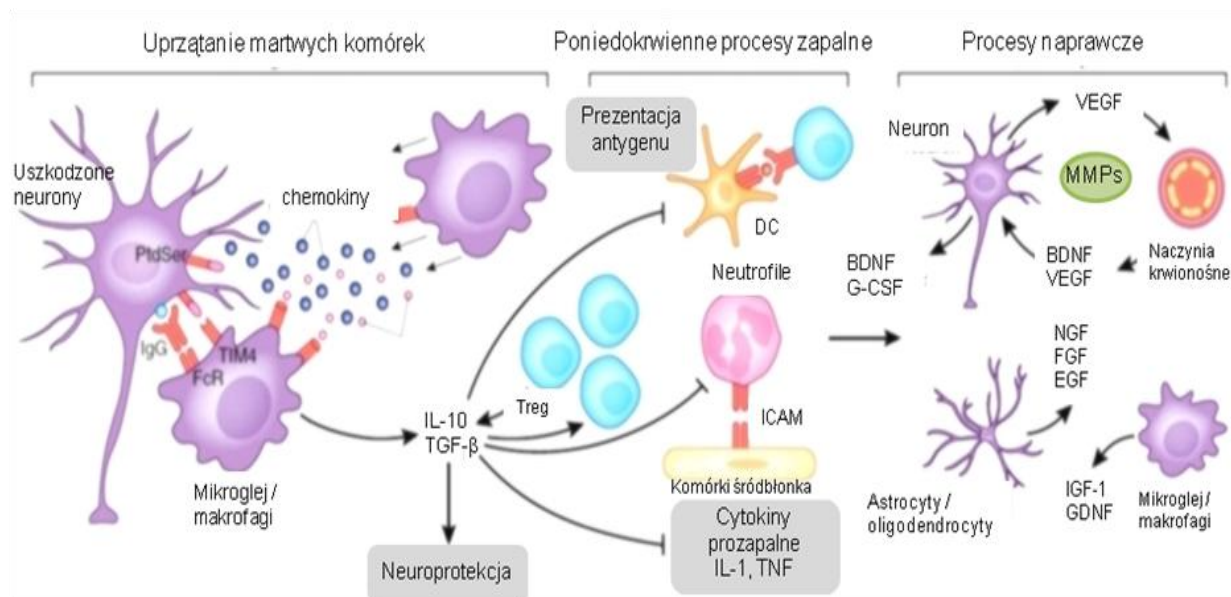


Ryc.1. Schemat przedstawiający postępujące uszkodzenie mózgu stopniowo obejmujące strefę półcienia (Kunz i wsp., 2010).

Rozmiar i szybkość pojawiania się zmian histologicznych w tkance nerwowej jest zależna od wielkości oraz czasu ograniczonego przepływu krwi. Z powodu specyfiki powstawania uszkodzenia, po zmniejszeniu przepływu krwi w rejonie uszkodzenia mózgu można wyróżnić dwie strefy. Pierwsza strefa, zwana centralną stanowi rdzeń uszkodzenia. Z uwagi na całkowite niedotlenienie w tej strefie dochodzi do obumarcia neuronów. Zmiany zachodzące w tym rejonie są bardzo szybkie i nieodwracalne (Taoufik i Probert, 2008). Druga strefa znajdująca się na obrzeżach rdzenia uszkodzenia to obszar, w którym przepływ krwi jest ograniczony, co powoduje utratę niektórych funkcji neuronów (brak potencjału czynnościowego, ale z zachowanym potencjałem spoczynkowym  $-70\text{mV}$ ), nazywana jest strefą półcienia (penumbra). W przypadku udaru mózgu strefa ta przyjmuje kształt półksiężyca i znajduje się pomiędzy zniszczoną tkanką rdzenia uszkodzenia, a zdrową tkanką (Astrup i wsp., 1981; Rafalowska i wsp., 2002). Hakim i wsp. (1987) zdefiniowali strefę półcienia jako obszar, w którym uszkodzenie jest odwracalne i zapewnienie normalnego przepływu krwi w określonym limicie czasowym skutkuje przywróceniem potencjału czynnościowego komórek nerwowych w tym rejonie. W kolejnych latach proponowano różne nieznaczne zmiany tej definicji (Selman i wsp., 1987; Memezawa i wsp.; 1992), jednak ostatecznie strefa półcienia została scharakteryzowana jako rejon z ograniczonym przepływem krwi, w którym komórki nerwowe znajdujące się w rejonie niedotlenienia mózgu zachowały niezmienny metabolizm energetyczny (Hossman, 1994b). Obecnie uważa się, że penumbra to rejon mózgu, w którym neurony są nieznacznie uszkodzone, ale wciąż żywe (Lo i wsp., 2008). Stąd strefa półcienia to obszar, który z powodu opóźnionej śmierci neuronów jest miejscem dającym największe nadzieje na działania terapeutyczne w leczeniu udaru mózgu (Heiss i wsp., 2012).

## 1.2. Reakcje immunologiczne towarzyszące ischemii mózgu

W uszkodzeniu tkanki nerwowej mózgu powstałym w wyniku udaru, biorą udział komórki układu immunologicznego. Efekt działania poszczególnych komórek może być różny, także korzystny w zależności od stopnia uszkodzenia tkanki, wielkości reakcji i ewentualnej wtórnej stymulacji innych mechanizmów neuroprotektynnych i naprawczych (Nawashiro i wsp., 2000; Zhang i wsp., 2000). Odpowiedź immunologiczna jest procesem złożonym, w którym biorą udział komórki różnych typów, mediatory zapalne i receptory zewnątrzkomórkowe.



Ryc.2. Schemat działania komórek odpowiedzi immunologicznej w procesach zachodzących w mózgu po niedokrwieniu (Iadecola i wsp., 2011, zmodyfikowany)

W ostrej fazie udaru mózgu obserwuje się pobudzenie efektorów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej odpowiedzialnych za usunięcie martwych komórek. Nagła śmierć komórek neuralnych w miejscu niedotlenienia i uwalnianie czynników związanych z uszkodzeniem tkanki (DAMP, *damage-associated molecular patterns*) stanowi istotę aktywacji lokalnych procesów odpornościowych w mózgu (Liew i wsp., 2005). Niektóre z tych czynników takich jak: białka szoku cieplnego, kwas moczowy, chromatyna, adenozylna i ATP, białko HMGB-1 (*high mobility group box chromosomal protein-1*), galektyny oraz tioredoksyny mają działanie pro-zapalne. Do pozostałych endogennych stymulatorów mechanizmów odpowiedzi wrodzonej należą między innymi: surfaktant A i D, kwas hialuronowy, fibrynogen (Chen i wsp., 2007; Rock i Kono, 2008).

Uwolnione przez komórki odpowiedzi wrodzonej cytokiny i chemokiny powodują aktywację ogólnej odpowiedzi immunologicznej. Fizyczne przerwanie połączeń między komórkami śródbłonnka naczyń mózgowych w następstwie zmian w barierze krew-mózg na skutek udaru, umożliwia rekrutację komórek odpowiedzi immunologicznej z krwi w rejon uszkodzenia mózgu.

### 1.2.1. Komórki immunologicznie czynne w mózgu

W badaniach eksperymentalnych przeprowadzanych na zwierzętach (Schilling i wsp., 2003, Vandeputte i wsp., 2010), podobnie jak w tych, opisywanych u ludzi (Gerhard i wsp., 2000) wykazano, że procesy towarzyszące niedokrwieniu mózgu związane są z nagłą aktywacją komórek mikrogleju oraz astrocytów.

Komórki mikrogleju, jako rezydujące w mózgu komórki immunokompetentne o właściwościach fagocytarnych, odgrywają istotną rolę jako efektorzy pierwszej linii obrony w miejscowych procesach patologicznych. W wyniku aktywacji po ischemii mózgu obserwuje się zwiększoną ekspresję receptorów dopełniacza (CR1, CR3, CR4) i receptorów dla fragmentu Fc  $\gamma$ -immunoglobulin (I, II, III), co umożliwia komórkom mikrogleju fagocytozę zniszczonych neuronów (Barnum, 1999). Ponadto, komórki mikrogleju mają zdolność prezentacji antygenów,

tym samym są zaangażowane w aktywację limfocytów (Ransohoff i Perry, 2009). Po udarze mózgu, w okolicy uszkodzenia komórki mikrogleju intensywnie proliferują, zwiększając swoją liczbę (Janowski i wsp., 2008). Aktywne komórki mikrogleju produkują cytokiny prozapalne w tym IL-1 $\beta$ , IL-6, czynnik martwicy nowotworów alfa (TNF- $\alpha$ , *tumor necrosis factor*) oraz inne związki o charakterze cytotoksycznym, np. tlenek azotu (NO, *nitric oxide*), reaktywne formy tlenu (ROS, *reactive oxygen species*) czy prostanoidy. Autorzy innych badań podkreślają zależność pomiędzy poziomem ekspresji IL-1 $\beta$  i IL-6 a wielkością uszkodzenia powstającego w wyniku niedokrwienia mózgu (Denes i wsp., 2010). Poziom aktywacji mikrogleju oraz ekspresji cytokin w wyniku ischemii może być odpowiedzialny za wielkość uszkodzenia tkanki nerwowej (Nakajima i Kohsoka 2004).

Działanie komórek mikrogleju nie zawsze jest negatywne. Wykazano, że produkowany przez te komórki TNF- $\alpha$  ma działanie neuroprotekcyjne w stosunku do neuronów, niwelując skutki niedotlenienia. Działanie to wykazano u myszy pozbawionych receptora TNF- $\alpha$  p55, u których po ischemii obserwowano wzrost obszaru uszkodzenia (Lambertsen i wsp., 2009). Ponadto, w licznych badaniach opisano inne czynniki uwalniane przez mikroglej jak neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*), czy insulinopodobny czynnik wzrostu-1 (IGF-1, *insulin-like growth factor*), które miały korzystny wpływ na procesy naprawcze w mózgu po udarze (Lucas i wsp., 2006, Ekdahl i wsp., 2009). Swoje działanie neuroprotekcyjne mikroglej może wywierać także poprzez uwalnianie neurotrofin, wychwyt glutaminianu czy usuwanie substancji neurotoksycznych (Koenigsnecht i Landreth 2004). Pozytywne działanie aktywnych komórek mikrogleju w rejonie niedokrwienia mózgu nie jest do końca wyjaśnione i nadal budzi szereg kontrowersji. Prawdopodobnie ma na to wpływ rodzaj i miejsce uszkodzenia. Doniesienia Clausen i wsp., (2008) sugerują, iż za produkcję poszczególnych czynników działających cytotoksycznie bądź protekcyjnie w ognisku niedokrwienia mogą być odpowiedzialne dwa różne podtypy komórek mikrogleju.

Astrocyty, będące komórkami efektorowymi miejscowej reakcji immunologicznej w mózgu odpowiadają na niedokrwienie produkcją mediatorów zapalenia w tym: ROS, cytokin, chemokin oraz proteaz (Markiewicz i Lukomska 2006; Thornton i wsp., 2008), których działanie może indukować apoptozę komórek. Zmiany metabolizmu astrocytów są widoczne już po 30 min od ischemii (Hagberg i wsp., 2001). Spadek wychwytu glutaminianu przez astrocyty i jednocześnie nadmierne jego uwalnianie z zakończeń synaptycznych prowadzi do uruchomienia mechanizmów ekscytotoksyczności, aktywacji receptorów glutaminergicznych, zmiany stężenia jonów wewnątrz komórek, co powoduje zaburzenia homeostazy jonowej w neuronach, upośledzenie ich funkcji i depolaryzację, prowadząc do śmierci neuronów (Łazarewicz, 2000; Lo i wsp., 2003; Semenov i wsp., 2008; Wang i Qin, 2010). Astrocyty wydają się być bardziej odporne na uszkodzenie wywołane niedotlenieniem niż neurony (Benavides i wsp., 2005). Jednak z uwagi na to, że wykazują obecność receptorów NMDA i AMPA są także narażone po ischemii mózgu na szkodliwe działanie wysokiego poziomu glutaminianu (Besancon i wsp., 2008). Podczas ischemii następuje rozluźnienie połączeń szczelinowych pomiędzy astrocytami (*gap junction*), co umożliwia przepływ czynników, które powodują zniszczenie komórek w rejonie penumbry (Cotrina i wsp., 1998). Wydaje się, że za to działanie mogą być odpowiedzialne proapoptotyczne substancje uwalniane z obumierających komórek (Lin i wsp., 1998), a także wapń, który napływając do rejonu penumbry poprzez otwarte połączenia pomiędzy astrocytami uruchamia mechanizmy ekscytotoksyczności, aktywując liczne ścieżki śmierci komórek (Budd i Lipton, 1998).

Astrocyty, podobnie jak komórki mikrogleju, mogą działać neuroprotekcyjnie. Wraz z cytokinami prozapalnymi takimi jak: IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , które powodują procesy neurodegeneracji (Dong i Benveniste, 2001), astrocyty uwalniają czynniki o działaniu przeciwzapalnym m.in. interleukiny (IL-4, IL-10, IL-12) oraz transformujący czynnik wzrostu beta

(TGF- $\beta$ 1, *transforming growth factor  $\beta$ 1*), promując przeżycie neuronów w ognisku niedotlenienia (Unsicker i Strelau, 2000). Feeney (2009) wykazał, że astrocyty w odpowiedzi na niedokrwienie mózgu uwalniają czynniki neurotroficzne takie jak czynnik wzrostu nerwów (NGF, *nerve growth factor*), BDNF i neuregulinę oraz biorą udział w procesie wychwytu glutaminianu. Ponadto, badania kilku ostatnich lat sugerują, że astrocyty poza korzystnym efektem zwiększania przeżywalności komórek nerwowych w rejonach niedokrwienia, zwiększają plastyczność neuronów, a także biorą udział w regulacji procesów angiogenezy, przyczyniając się do poprawy zdolności funkcjonalnych upośledzonych w wyniku udaru mózgu (Zhao i Rempé 2010).

Najnowsze wyniki badań wskazują na czynne zaangażowanie neuronów w procesy odpowiedzi immunologicznej w OUN. Mimo utrzymującego się przez wiele lat paradygmatu postulującego jedynie pasywną rolę neuronów, dziś wiadomo, że mogą one pełnić rolę efektorów w procesach niedokrwienia mózgu. Szereg czynników uwalnianych przez komórki nerwowe np. neuropeptydy czy transmittery, również białka błonowe CD22, CD47, CD200, CX3CL1 (fraktalina), cząsteczki adhezji międzykomórkowej (ICAM), cząsteczki adhezji neuronów (NCAM), semaforyna i lektyna typu C zostały opisane jako zaangażowane w regulację procesów odpornościowych (Tian i wsp., 2009). Ekspresja receptorów kanabinoidów (CB1) może sugerować udział neuronów w hamowaniu procesów zapalnych w OUN. Myszy pozbawione genu CB1 wykazywały silniejsze objawy doświadczalnego zapalenia mózgu i rdzenia (EAE) (Pryce i Baker 2007). Neurony wspomagają również różnicowanie komórek T-regulatorowych (Treg), które kontrolują proliferację limfocytów T cytotoksycznych ograniczając procesy zapalne w mózgu (Liu i wsp., 2006).

Komórkami biorącymi udział w regulacji procesów immunologicznych w mózgu są także komórki śródbłonna naczyń. Aktywacja komórek śródbłonna naczyń mózgowych jest istotną reakcją w odpowiedzi na proces ischemii, powodowaną przez hipoksję *per se*, komórki glejowe i neurony, a także krążące komórki krwi. Aktywowane komórki śródbłonna wykazują ekspresję mediatorów zapalnych, w tym cytokin i chemokin, oraz zwiększony poziom cząsteczek adhezyjnych tj. E-selektyny, ICAM-1, VCAM-1, co powoduje adhezję komórek krwi obwodowej takich jak płytki krwi, neutrofile, monocyty oraz limfocyty (Denes i wsp., 2010). Przerwanie bariery krew-mózg umożliwia wynaczynienie tych elementów morfotycznych krwi do tkanki. W odpowiedzi na ischemię obserwuje się zmniejszenie stabilności białek tworzących połączenia w tym okludyny i kładyny wchodzących w skład ścisłych połączeń komórkowych w naczyniach krwionośnych i degradację kolagenu IV, stanowiącego składnik błony podstawnej ściany naczyń u ludzi (Rosell i wsp., 2008) i szczurów (Kwon i wsp., 2009). Towarzyszy temu zwiększenie ilości i aktywności metaloproteinaz (MMP) (Liu i wsp., 2009b). W wyniku uszkodzenia mózgu po udarze obserwuje się szczególnie wzrost MMP-9, odpowiedzialnej za degradację błony podstawnej i połączeń astrocytów z komórkami śródbłonna (Candelario-Jalil i wsp., 2009).

### 1.2.2. Reakcje zapalne towarzyszące udarowi mózgu z udziałem komórek immunologicznie czynnych krwiopochodnych

Po udarze obserwuje się zmiany w obrazie krwi na obwodzie m.in. neutrofilię, limfocytopenię i monocytopenię (Ross i wsp., 2007). Wzrost liczby neutrofilii i monocytów w krwi obwodowej może być następstwem niedotlenienia mózgu, pojawia się 24 godziny po udarze i utrzymuje się, przez co najmniej 7 dni (Emsley i wsp., 2003).



Uprzywilejowanie immunologiczne mózgu ma związek z istniejącą barierą krew-mózg, która uniemożliwia swobodny przepływ komórek i reguluje przejście związków rozpuszczonych oraz jonów z krwi do OUN (Carson i wsp., 2006). Selektywne przechodzenie substancji do mózgu ma miejsce tylko w naczyniach włosowatych, natomiast migracja komórek jest możliwa w naczyniach przedwłosowatych, gdzie proces ten jest kontrolowany przez cząsteczki adhezyjne, cytokiny, chemokiny oraz ich receptory (Owens i wsp., 2008). W proces regulacji właściwości bariery krew-mózg, oprócz komórek śródbłonna, zaangażowane są komórki mikrogleju, astrocyty oraz neurony. Prozapalne cytokiny uwalniane z aktywowanych komórek mikrogleju i astrocytów powodują naruszenie bariery krew-mózg a następnie stymulują procesy gliozy (Somera-Molina i wsp., 2009). Dodatkowo, cytokiny powodują wzrost ekspresji białek adhezyjnych (CAM; *cell adhesion molecules*), co wspomaga przyleganie leukocytów do ściany naczyń krwionośnych oraz umożliwia ich migrację do mózgu z równoczesnym uwalnianiem mediatorów zapalenia (Huang i wsp., 2006).

W wyniku udaru obserwuje się przechodzenie elementów morfotycznych krwi i ich obecność w okolicach uszkodzonej tkanki nerwowej. W badaniach eksperymentalnych w modelu zamknięcia tętnicy środkowej mózgu (MCAO - *middle cerebral artery occlusion*), widoczna jest akumulacja neutrofilii w mózgu już po 30 min od zamknięcia tętnicy środkowej (Huang i wsp., 2006). Przy przechodzeniu neutrofilii przez ścianę naczyń mózgowych zaangażowane są cząsteczki adhezyjne m.in. selektyny, integryny i immunoglobuliny, których ekspresję regulują mechanizmy wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe z udziałem cytokin. Proces ten jest ułatwiony przez przerwanie bariery krew-mózg. Neutrofile, gromadząc się w rejonie niedokrwienia mózgu, uwalniają cytokiny prozapalne, wolne rodniki tlenowe i enzymy proteolityczne, powodując dodatkowe zniszczenie tkanki nerwowej szczególnie w strefie półcienia otaczającej rdzeń uszkodzenia (Wang i Qin, 2007). Zmniejszenie nacieku neutrofilii, ograniczenie ich adhezji do ściany naczyń, czy zahamowanie ich funkcji powodowało zmniejszenie obszaru udaru w badaniach eksperymentalnych udaru mózgu u myszy (Chopp i wsp., 1997; Chou i wsp., 2004).

Limfocyty wydają się być odpowiedzialne za wtórne uszkodzenie tkanki nerwowej w odpowiedzi na ischamię mózgu. Obserwuje się je w ciągu pierwszych 24 godzin od wystąpienia udaru (Schroeter i wsp., 1994). Limfocyty zlokalizowane są najczęściej na obrzeżach uszkodzenia, blisko naczyń krwionośnych (Stevens i wsp., 2002). Mechanizmy odpowiedzialne za infiltrację limfocytów w mózgu nie zostały jak dotąd wyjaśnione. Wydaje się, że przerwanie bariery krew-mózg odgrywa zasadniczą rolę w przechodzeniu limfocytów do OUN, pozwalając im na swobodny ruch. Odpowiedzialne za to mogą być także antygeny uwalniane z uszkodzonych komórek mózgu, które powodują aktywację limfocytów i ułatwią transmigrację przez ścianę naczynia. Pierwsze doniesienia o udziale limfocytów w procesach zapalnych po udarze niedokrwinnym dotyczyły badań eksperymentalnych, w których blokowano migrację limfocytów przez ścianę naczyń mózgowych, co skutkowało zmniejszeniem obszaru uszkodzonej tkanki, powstałym po zamknięciu tętnicy środkowej mózgu u szczurów (Becker i wsp., 2001). Wykazano, że zarówno limfocyty T jak i B biorą udział w powstawaniu dodatkowych zmian w obszarze uszkodzenia mózgu po udarze (Hum i wsp., 2007). Głównym mechanizmem odpowiedzialnym za uszkodzenie tkanki nerwowej po ischemii przez limfocyty T, jest produkcja cytokin prozapalnych tj. IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  i TNF- $\beta$  (Vogelgesang i wsp., 2010). Istota działania limfocytów B w procesie zapalnym po udarze mózgu nie została jak dotąd określona.

### 1.2.3. Mediatorzy zapalenia towarzyszące udarowi mózgu

W wyniku udaru mózgu obserwuje się zmiany w poziomie cytokin i chemokin będących mediatorami procesów zapalnych (Gong i wsp., 1998). Podczas ischemii cytokiny takie jak: IL-1, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , i chemokiny np. cytokina indukowana chemoatraktantem dla neutrofilii (CINC, *cytokine-induced neutrophil chemoattractant*) i białko chemotaktyczne dla monocytów (MCP-1, *monocyte chemoattractant protein-1*) są wytwarzane przez aktywowane komórki śródbłonka, astrocyty, mikroglej, neurony, leukocyty, limfocyty i płytki krwi (Ridet i wsp., 1997; Barone i Feuerstein 1999; Huang i wsp., 2006).

W badaniach eksperymentalnych u zwierząt obserwuje się wzrost mRNA IL-1, a w szczególności IL-1 $\beta$ , w komórkach mózgu już w ciągu kilku pierwszych godzin po udarze (Fan i wsp., 1995, Rothwell 1999; Lu i wsp., 2005). Wczesną ekspresję IL-1 wyrażają głównie komórki mikrogleju oraz makrofagi znajdujące się w okolicach naczyń krwionośnych. Interleukina-1 może być uwalniana przez astrocyty i komórki śródbłonka, a także neurony. Nie wiadomo, jaki jest mechanizm niszczącego działania IL-1 po udarze mózgu. Możliwe jest, iż stymulacja uwalniania kwasu arachidonowego, wzmożenie efektu ekcytotoksycznego wywołanego przez NMDA i stymulacja syntezy tlenku azotu może przyczynić się do progresji procesu patologicznego w rejonie uszkodzenia (Huang i wsp., 2006). Dodatkowo, rekrutacja i wzmożona adhezja neutrofilii poprzez zwiększenie ekspresji cząsteczek adhezyjnych w błonie komórek śródbłonka naczyń mózgowych przez IL-1 może wyjaśniać jej pośredni negatywny wpływ powodujący powiększenie obszaru zniszczonej tkanki (Yamasaki i wsp., 1997). Podanie egzogennej IL-1 $\beta$  dokomorowo zwiększa uszkodzenie wywołane niedokrwieniem, natomiast zahamowanie działania IL-1 poprzez podanie antagonisty jej receptora (IL-1ra), ogranicza wielkość powstającej w wyniku niedotlenienia lezji (Banwell i wsp. 2009). Ponadto, IL-1 odgrywa kluczową rolę w regulacji aktywności MMP-9, zarówno podczas ostrej jak i przewlekłej fazy udaru (Ruhul Amin i wsp., 2003), co prowadzi do zwiększenia przepuszczalności bariery krew-mózg poprzez trawienie białek połączeń ścisłych (Yang i wsp., 2007).

Podobnie jak w przypadku IL-1, w eksperymentalnym modelu udaru mózgu MCAO u szczurów obserwuje się wzrost ekspresji mRNA IL-6 już po 3 godz. od zamknięcia tętnicy środkowej mózgu (Wang i wsp., 1995). Interleukina-6 jest produkowana głównie przez makrofagi oraz limfocyty T. W mózgu komórkami odpowiedzialnymi za syntezę IL-6 są astrocyty i komórki mikrogleju (Norenberg, 2005). Interleukina-6 wiąże się ze specyficznym receptorem błonowym (IL-6R), co prowadzi do aktywacji wielu genów regulatorowych. Biologiczna aktywność IL-6 wzmacnia działanie IL-1, a dane uzyskane z badań u ludzi wskazują na jej efekt prozapalny towarzyszący udarowi mózgu. Interleukina-6 razem z IL-1 i TNF- $\alpha$  jest niezbędna do aktywacji białek ostrej fazy. Poziom IL-6 w krwi obwodowej chorych po udarze jest wyższy niż u ludzi zdrowych, co obserwowano kilka godzin po wystąpieniu udaru. Ponadto, wysoki poziom IL-6 w surowicy krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym koreluje z większym obszarem uszkodzenia tkanki i niekorzystnymi prognozami klinicznymi (Tarkowski i wsp., 1995; Vila i wsp., 2000). Co ciekawe, IL-6 wykazuje również efekt przeciwzapalny hamując działanie IL-1 poprzez syntezę antagonisty jej receptora (IL-1Ra) (Relton i wsp., 1996). Nie wiadomo, w jakiej fazie udaru IL-6 ma działanie negatywne, a w jakiej pozytywne.

Wraz ze wzrostem mRNA IL-1 i IL-6, obserwowanym kilka godzin po ischemii mózgu, notuje się również wzrost ekspresji mRNA TNF- $\alpha$ . Czynniki te produkowane głównie przez aktywowane monocyty, makrofagi, limfocyty T i B, neutrofile oraz komórki tuczne, w OUN wytwarzany jest także przez astrocyty i komórki mikrogleju. Czynniki martwicy nowotworów

wywiera swój biologiczny efekt poprzez interakcje z dwoma wysoce specyficznymi receptorami: R1 (p55) i R2 (p75). W wyniku działania na receptor R1, TNF- $\alpha$  przekazuje sygnał śmierci komórki za pośrednictwem ścieżki FADD (domena śmierci związana z Fas; *Fas associated death domain*) natomiast przez receptor R2 powoduje aktywację czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B. Wykazano, że TNF- $\alpha$  pełni istotne funkcje w OUN, m.in. regulując przeżywalność glutaminergiczne oraz aktywację astrocytów (Pickering i wsp., 2005). Powodując aktywację, proliferację oraz hipertrofię komórek mikrogleju, TNF- $\alpha$  zwrótnie reguluje swoją własną syntezę (Kita i wsp., 1997). Wyniki badań, zarówno eksperymentalnych jak i klinicznych, dowiodły pozytywnej korelacji pomiędzy poziomem TNF- $\alpha$  i obszarem uszkodzenia tkanki po udarze (Zaremba i wsp., 2001). Podobnie jak IL-1, TNF- $\alpha$  zwiększa ekspresję cząsteczek adhezyjnych na komórkach śródbłonna naczyń mózgowych, ułatwiając gromadzenie się neutrofilii i ich transmigrację z krążenia obwodowego do mózgu. Dodatkowo, TNF- $\alpha$  stymuluje produkcję białek ostrej fazy oraz innych mediatorów prozapalnych i powoduje uszkodzenie bariery krew-mózg, co wykazano po podaniu domózgowym u myszy. Badania z użyciem przeciwciał anti-TNF- $\alpha$  wstrzykniętych bezpośrednio do układu komorowego, ograniczało obszar uszkodzenia w wyniku wcześniej wywołanej ischemii mózgu u szczurów (Nawashiro i wsp., 1997).

Istnieją także doniesienia sugerujące neuroprotektoryjne działanie TNF- $\alpha$  w patogenezie udaru oraz jego udział w tolerancji na uszkodzenie mózgu, zarówno ischemiczne jak i pourazowe (Figiel i wsp., 2008, Liu i wsp., 2000). Podanie TNF- $\alpha$  zwierzętom przed wywołaniem niedotlenienia powodowało znaczącą tolerancję na obniżoną podaż tlenu, czego dowodem był lepszy stan zwierząt oraz zmniejszenie wielkości lezji (Liu i wsp., 2000). Kalluri i Dempsey (2008) sugerują zaangażowanie TNF- $\alpha$ 1, którego ekspresja wzrasta po niedotlenieniu mózgu, w promowaniu różnicowania neuronalnego. Eksperymentalny udar mózgu u myszy z mutacją wykluczającą gen TNF- $\alpha$ , powodował zwiększenie uszkodzenia oraz pogorszenie stanu neurologicznego zwierząt w porównaniu z osobnikami kontrolnymi (Gary i wsp., 1998).

Inną cytokiną towarzyszącą uszkodzeniu tkanki nerwowej po ischemii mózgu jest TGF- $\beta$ . W eksperymentalnych modelach udaru mózgu wzrost ekspresji mRNA TGF- $\beta$  w uszkodzonej tkance nerwowej pojawia się 1-6 godzin po udarze i utrzymuje się do 2-3 tygodni (Wiessner i wsp., 1993). Komórkami wykazującymi zdolność syntezy TGF- $\beta$  w mózgu są astrocyty i komórki mikrogleju, a także napływające z krwi monocyty i limfocyty. Działanie TGF- $\beta$  badano zarówno po iniekcji tego czynnika dożylnie jak i do tętnicy szyjnej. W obu przypadkach wykazano neuroprotektoryny efekt działania TGF- $\beta$ , a czas jego podania przed lub po ischemii nie miał większego znaczenia (McNeill i wsp., 1994; Huang i wsp., 2006). Wydaje się, że neuroprotektoryne działanie TGF- $\beta$  jest wynikiem aktywacji wielu mechanizmów zabezpieczających neurony przed śmiercią. Wśród nich należy wymienić protektoryny efekt TGF- $\beta$ 1 przed uszkodzeniem spowodowanym ekscytotoksycznym działaniem glutaminianu, co wykazano w badaniach *in vitro* czy potwierdzający ten efekt eksperyment z zastosowaniem czynnika blokującego TGF- $\beta$ 1, co skutkowało wzrostem obszaru uszkodzenia po ischemii mózgu (Ruocco i wsp., 1999; Huang i wsp., 2006). Ponadto, podanie TGF- $\beta$  do tętnicy szyjnej powodowało obniżenie liczby krążących neutrofilii, co może ułatwiać przepływ krwi w okresie po udarze (Mori i wsp., 1992). Istnieją także doniesienia, iż TGF- $\beta$  odgrywa pozytywną rolę w ograniczeniu dysfunkcji komórek śródbłonna naczyń po ischemii (Lefter i wsp., 1993).

U pacjentów z udarem mózgu obserwowano wysoki poziom IL-10 w osoczu krwi. Poziom IL-10 skorelowany był ze stanem neurologicznym pacjenta (Vila i wsp., 2003). Interleukina-10, znana również jako czynnik hamujący syntezę cytokin (CSIF, *cytokine synthesis inhibition factor*), produkowana jest przez wiele typów komórek, głównie monocyty, makrofagi, limfocyty T, limfocyty B oraz komórki tuczne. W OUN głównym źródłem IL-10 są komórki mikrogleju oraz astrocyty (Williams i wsp., 1996). Ekspresja IL-10 wzrasta podczas wielu schorzeń OUN.

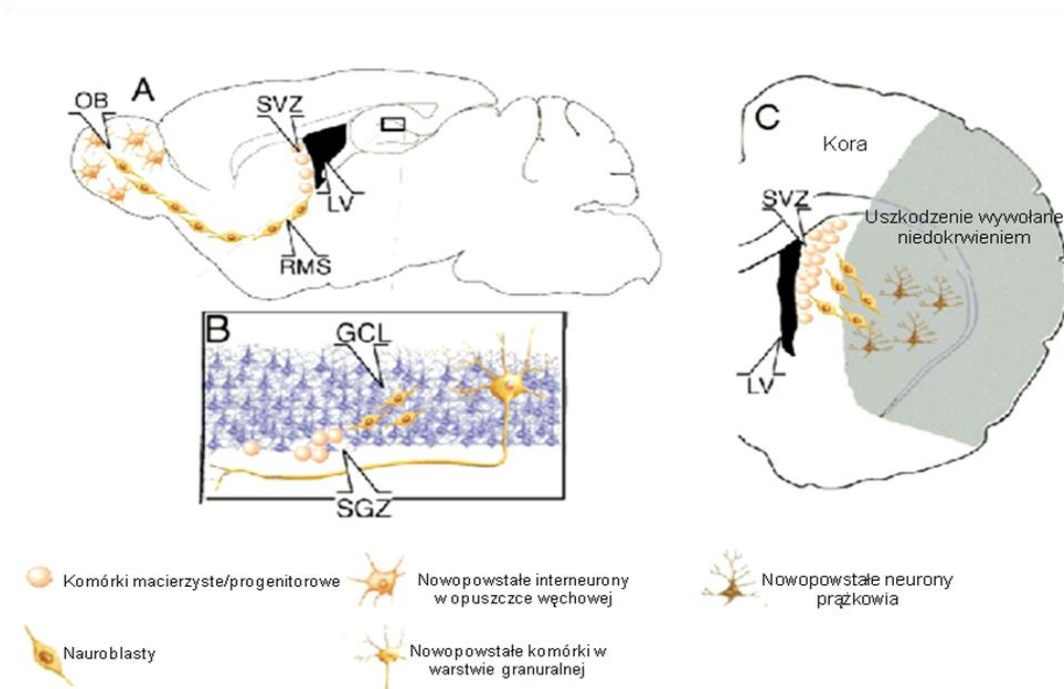
Wykazano, iż IL-10 ma działanie przeciwzapalne, promuje przeżycie neuronów i komórek glejowych w mózgu poprzez blokadę działania proapoptotycznych cytokin oraz zwiększenie ekspresji sygnałów przeżycia komórek (Spera i wsp., 1998). Stymulacja receptora IL-10 jest ważna w regulacji licznych ścieżek sygnałowych związanych ze śmiercią lub przeżyciem komórek, włączając w to ścieżki Jak1/Stat3, PI 3-kinaza, MAPK, SOCS i NF-κB. Interleukina-10 ogranicza reakcje immunologiczne, powodując spadek ekspresji antygenów MHC klasy II oraz cząsteczek ko-stymulujących w komórkach prezentujących antygen. Hamuje syntezę cytokin prozapalnych takich jak: interferon-γ (IFN-γ), IL-2, IL-3 i czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów (G-CSF, *granulocyte-colony stimulating factor*), produkowanych przez makrofagi, mikroglej czy limfocyty T regulatorowe (Treg) (Koch i wsp., 1997, de Waal Malefyt i wsp., 1991). Dodatkowo, indukuje inaktywację komórek T poprzez zahamowanie ścieżki sygnałowej związanej z ko-stymulacją receptorów CD28-CD80/86 (Akdis i wsp., 1998). Promuje również przeżycie komórek B, ich proliferację oraz produkcję przeciwciał. Ooboshi (2005) wykazał, że po ogniskowym niedotlenieniu mózgu u szczurów podanie wektora adenowirusa kodującego ludzką IL-10 powoduje ograniczenie wielkości uszkodzenia, natomiast u myszy pozbawionych genu IL-10 obserwuje się zwiększenie obszaru lezji w porównaniu do zwierząt typu dzikiego (Grilli i wsp., 2000). Dane eksperymentalne o neuroprotekcijnym działaniu IL-10 znalazły również potwierdzenie w badaniach klinicznych.

Wzrostowi aktywności cytokin po ischemii mózgu towarzyszy także wzrost ekspresji chemokin w tym: mRNA CINC i MCP-1, który obserwowano u szczurów w eksperymentalnym modelu udaru (MCAO) po 6 godzinach od zaciśnięcia tętnicy środkowej mózgu (Minami i Satoh, 2000). Źródłem CINC i MCP-1 są aktywowane astrocyty i komórki mikrogleju w rejonie uszkodzenia. Wzrost ekspresji tych chemokin powoduje napływ neutrofilii do miejsca uszkodzenia (Huang i wsp., 2006). Podanie przeciwciał anti-CINC szczurom po ischemii zmniejsza obrzęk mózgu i obszar uszkodzenia, co wydaje się atrakcyjnym narzędziem terapeutycznym w leczeniu skutków udaru u ludzi.

Działanie MCP-1 ma także pozytywny efekt, powoduje wyjście prekursorów neuralnych z niszy i indukuje migrację neuroblastów w tkance w kierunku uszkodzenia (Yan i wsp., 2007).

### 1.3. Endogenne procesy naprawcze po ischemii mózgu

Procesy neurogenezy wywołane niedotlenieniem mózgu są procesami kompensacyjnymi, regulowanymi przez wiele różnych czynników (Iwai i wsp., 2002). Badania eksperymentalne wykazały, iż w następstwie ischemii mózgu obserwuje się aktywację procesu neurogenezy w strefie okołokomorowej (SVZ – *subventricular zone*) oraz w strefie podziarnistej zakrętu zębatego hipokampa (SGZ – *subgranular zone*) gryzoni i migrację nowopowstałych neuroblastów w kierunku uszkodzenia (Liu Ji i wsp., 1998; Jin i wsp., 2001; Zhu i wsp., 2003; Zhang i wsp., 2004; Yamashita i wsp., 2006, Ekdahl i wsp., 2003).



Ryc.3. Schemat procesu neurogenezy w mózgu dorosłych szczurów, w stanie fizjologicznym i po ischemii (Ekdahl, 2009)

Stymulację procesu neurogenezy w następstwie udaru opisano również u ludzi, w tym u pacjentów w podeszłym wieku (Jin i wsp., 2006; Macas i wsp., 2006; Minger i wsp., 2007). Te odkrycia stwarzają możliwości terapii mającej na celu repopulację uszkodzeń OUN powstałych w wyniku udaru mózgu.

### 1.3.1. Proces neurogenezy po ischemii mózgu

Fizjologicznie, neuroblasty powstałe na skutek proliferacji komórek macierzystych w SVZ migrują do opuszki węchowej (Doetsch i wsp., 1997; Curtis i wsp., 2007). Ostre uszkodzenia OUN, takie jak udar, indukują wzrost proliferacji progenitorów neuralnych w strefie SVZ tożsamej z rejonem uszkodzenia oraz migrację neuroblastów do obszarów niedokrwienia w obrębie prążkowie i kory (Yagita i wsp., 2001; Schmidt i Reymann, 2002; Tanaka i wsp., 2004; Thored i wsp., 2006; Kaneko i Sawamoto, 2009). Z badań eksperymentalnych wynika, że 48 godzin po ischemii mózgu widoczny jest wzrost liczby proliferujących komórek w strefie SVZ dorosłych szczurów. Procent aktywnie dzielących progenitorów neuralnych po 7 dniach osiąga dwukrotnie większą wartość w porównaniu z liczbą proliferujących komórek u zdrowych zwierząt i choć po 14 dniach procent komórek aktywnych mitotycznie obniża się (24% vs 15% u szczurów niepoddanych udarowi), proces neurogenezy u gryzoni obserwowano przez 6 miesięcy po udarze (Chen i wsp., 2004; Zhang i wsp., 2007). Ponadto zmienia się długość cyklu komórkowego proliferujących w strefie SVZ progenitorów neuralnych. W badaniach *in vivo* wykazano dynamiczne zmiany długości cyklu dzielących się komórek w pierwszych 2 tygodniach po ischemii (11 godzin vs 19 godzin u szczurów zdrowych). Skrócenie fazy G1 cyklu komórkowego obserwowane 2 dni po udarze jest związane ze wzrostem dzielących się komórek potomnych, które pozostają w cyklu, aby zwiększyć pulę komórek progenitorowych w SVZ. Natomiast wydłużenie fazy G1 cyklu komórkowego 4 -14 dni po ischemii towarzyszy zablokowaniu podziałów komórkowych, co hamuje samonawianie progenitorów neuralnych, których komórki potomne wchodzi na ścieżkę różnicowania w neurony. Wydaje się, że za

zablokowanie proliferacji odpowiedzialny jest TGF- $\beta$ , zwiększając ekspresję inhibitorów cyklu komórkowego w niszy i powodując migrację komórek z niszy do otaczającej tkanki, gdzie nie mają one możliwości podziałów (Choi i wsp., 2005). Te obserwacje eksperymentalne dowodzą, że proces niedokrwienia mózgu powoduje zmiany cyklu aktywnie dzielących się komórek, co powoduje początkowo zwiększenie puli progenitorów neuralnych w strefach neurogennych, a później ich różnicowanie w neurony (Zhang i wsp., 2008).

W literaturze opisane są liczne badania przeprowadzone po udarze mózgu nie tylko u gryzoni, ale także u innych ssaków, w tym małp i ludzi, potwierdzające stymulację neurogenezy poprzez procesy niedotlenienia w OUN (Kawai i wsp., 2004; Koketsu i wsp., 2006; Pereira i wsp., 2007). Analiza *post mortem* mózgow pacjentów po udarze wykazała wzrost proliferacji w rejonie SVZ i zwiększoną liczbę neuroblastów (Macas i wsp., 2006). Barwienia immunocytochemiczne preparatów biopsji mózgu chorych po ischemii ujawniły komórki o cechach nowopowstałych neuronów, zgromadzone w rejonie uszkodzenia, w sąsiedztwie naczyń krwionośnych (Jin i wsp., 2006). Dane uzyskane u ludzi potwierdzają wyniki badań eksperymentalnych, iż niedotlenienie mózgu u starszych osób stymuluje endogenne procesy neurogenezy. Poza dobrze udokumentowanymi i opisanymi wynikami proliferacji komórek neuralnych w strefach neurogennych, wykazano zwiększoną proliferację komórek również w korze w pobliżu miejsca uszkodzenia (Shin i wsp., 2008). Dodatkowo, niedotlenienie mózgu może powodować mobilizację i rekrutację komórek macierzystych ze szpiku kostnego (Liu i wsp., 2009).

### 1.3.2. Czynniki neurotroficzne w procesach regeneracji OUN po ischemii mózgu

Molekularne mechanizmy odpowiedzialne za stymulację procesu neurogenezy w następstwie ischemii mózgu nie zostały jak dotąd szczegółowo zdefiniowane. Uszkodzeniu tkanki nerwowej towarzyszy wzrost czynników neurotroficznych, które wydają się być odpowiedzialne za modulację poszczególnych etapów procesu neurogenezy, regulację proliferacji i różnicowania progenitorów neuralnych, działania ochronne i neuroprotektoryjne w stosunku do powstałych nowych neuronów.

Wśród czynników neurotroficznych największą rolę w procesach neurogenezy przypisuje się: NGF, BDNF, neurotrofinom 3 i 4 (NT-3, *neurotrophin-3*; NT-4, *neurotrophin-4*), czynnikowi neurotroficznemu pochodzenia glejowego (GDNF, *glial-derived neurotrophic factor*), czynnikowi pochodzącemu z nabłonka barwnikowego siatkówki (PEDF, *pigment epithelium-derived factor*), rzęskowemu czynnikowi neurotroficznemu (CNTF, *ciliary neurotrophic factor*) i niedawno opisanym: śródmózgowemu czynnikowi neurotroficznemu pochodzenia astrocytarnego (MANF, *mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor*) oraz mózgowemu dopaminowemu czynnikowi neurotroficznemu (CDNF, *cerebral dopamine neurotrophic factor*).

Czynnik wzrostu nerwów (NGF) jest odpowiedzialny za proliferację i różnicowanie prekursorów neuralnych oraz zwiększa przeżycie nowopowstałych neuronów (Mashayekhi, 2008). W OUN NGF produkowany jest głównie przez astrocyty. Największe stężenie tego czynnika stwierdzono w hipokampie. Wyniki badań eksperymentalnych ekspresji NGF po uszkodzeniu mózgu są kontrowersyjne (Chiaretti i wsp., 2008; Cheng i wsp., 2009). Podanie NGF lub BM-MSK zmodyfikowanych genetycznie produkujących NGF, szczerom w eksperymentalnym modelu ischemii (MCAO) skutkowało wzrostem proliferacji komórek w SVZ i w prążkowie, zwiększonym przeżyciem nowopowstałych neuronów w hipokampie w półkuli tożsamej z uszkodzeniem oraz zmniejszeniem obszaru lezji (Guégan i wsp., 1998; Frielingsdorf

i wsp., 2007; Ding i wsp., 2011). NGF wykazuje nie tylko działanie neuroprotekcyjne, ale także immunomodulacyjne, ograniczając procesy zapalne poprzez obniżenie ekspresji antygenów MHC klasy II i ekspresji cząsteczek ko-stymulatorowych w komórkach mikrogleju a także uszczelnienie bariery krew-mózg (Colafrancesco i wsp., 2011). Działanie NGF ułatwia przepływ krwi w korze mózgowej i przeciwdziała niedokrwieniu pourazowemu poprzez swoje działanie troficzne m.in. wzrost ekspresji receptora nikotynowego w mózgu (Murdoch i wsp., 1998). Obserwowane zmiany w ekspresji NGF mogą odpowiadać endogennym mechanizmom neuroprotekcijnym, ograniczającym negatywne działanie czynników biochemicznej i molekularnej kaskady uruchamianej przez uraz (Koizumi i wsp., 2006).

Neurotropowy czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF) odgrywa istotną rolę w procesie neurogenezy po niedokrwieniu. Źródłem BDNF jest aktywny mikroglej. Podawanie egzogennych komórek mikrogleju do komór mózgu myszy po ischemii powoduje wzrost ekspresji BDNF w hipokampie i zwiększenie proliferacji komórek w strefie SGZ (Kitamura i wsp., 2004). Wykazano, iż BDNF jest produkowany także przez komórki śródbłonna i neurony (Snapyan i wsp., 2009). Bierze udział w regulacji neurogenezy w rejonie SVZ oraz w migracji komórek progenitorowych z rejonu SVZ do uszkodzonego prążkowie (Schäbitz i wsp., 2007). Infuzja BDNF do komór bocznych dorosłych szczurów powoduje podwojenie liczby nowopowstałych neuronów w rejonie opuszki węchowej i tworzenie połączeń synaptycznych (Zigova i wsp., 1998; Bath i wsp., 2010). Ponadto, zwiększona ekspresja BDNF w rejonach nie neurogennych np. w prążkowie, promuje przeżycie przeszczepionych progenitorów neuralnych (Chen i wsp., 2007). Badania innych grup naukowców wykazały negatywny wpływ BDNF na neurogenezę (Galvao i wsp., 2008). Heterozygotyczne myszy z delecją BDNF wykazują wzrost neurogenezy oraz poprawę funkcji motorycznych po niedokrwieniu w porównaniu ze zwierzętami typu dzikiego (Nygren i wsp., 2006a). Wydaje się, że działanie BDNF jest w dużej mierze zależne od obecności innych czynników w tym neurotrofiny-3, która wykazuje silne działanie neuroregeneracyjne czy FGF-2. Konieczność współdziałania kilku czynników neurotroficznymi sugerują doświadczenia z wykorzystaniem zwierząt genetycznie zmodyfikowanych, pozbawionych jednej z neurotrofin.

Czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego (GDNF), podobnie jak NGF i BDNF, zwiększa przeżycie nowopowstałych neuronów w tkance. Wstrzyknięcie GDNF do bocznych komór mózgu u zwierząt po krótkotrwałej MCAO powoduje istotne statystycznie zwiększenie proliferacji progenitorów neuralnych w obydwu głównych strefach neurogennych: SVZ oraz SGZ u dorosłych szczurów (Dempsey i wsp., 2003). Egzogenny GDNF podany domózgowo szczurom po ischemii hamuje apoptozę, zmniejszając liczbę neuronów kaspazo-3-pozytywnych i cytochrom-3-immunoreaktywnych, co ogranicza obszar uszkodzenia i obrzęk mózgu (Yamashita i wsp., 2009). Transplantacja neuralnych lub hematopoetycznych komórek macierzystych zmodyfikowanych przez wprowadzenie genu GDNF u zwierząt po udarze powoduje wzrost ilości GDNF w uszkodzonej tkance, dłuższe przeżycie komórek dawcy i ich różnicowanie w kierunku dojrzałych neuronów (Chen i wsp., 2009; Ou i wsp., 2010; Young i wsp., 2010). Implantacja komórek mezenchymalnych, izolowanych ze szpiku kostnego do mózgu zwierząt po niedotlenieniu, powodowała znaczny wzrost ekspresji GDNF, zwiększoną proliferację oraz migrację neuroblastów ze strefy SVZ do tkanki. Dodatkowo, obserwowano zmniejszenie liczby komórek apoptotycznych w strefie lezji (Shen i wsp., 2010).

Czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego odgrywa również pozytywną rolę w migracji neuroblastów do miejsc uszkodzenia tkanki po ischemii (Paratcha i wsp., 2006). Po bezpośrednim, domózgowym podaniu GDNF obserwuje się poprawę deficytów motorycznych, jednak jego zastosowanie w klinice jest ograniczone z uwagi na to, iż nie przechodzi przez barierę krew mózg, a więc nie może być podawany systemowo.

Czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego siatkówki (PEDF), pierwotnie scharakteryzowany jako białko typowe dla nabłonka barwnikowego siatkówki, w obrębie OUN u ludzi występuje w neuronach i astrocytach w różnych rejonach mózgu, wykazując silną ekspresję m.in. w korze mózgowej i hipokampie (Tombran-Tink i wsp., 1996). Działanie neuroprotekcyjne i antyapoptotyczne w stosunku do neuronów wykazano w badaniach *in vitro* (Marciniak i wsp., 2006). Komórki ziarniste mózdzku z nadekspresją PEDF stają się dużo bardziej odporne na neurotoksyczne działanie glutaminianu w porównaniu z komórkami niemodyfikowanymi (Yabe i wsp., 2005). Sanagi i wsp. (2008) opisali również neuroprotekcyjne i immunomodulacyjne działanie tego czynnika *in vivo* w modelu zwierzęcym ischemii mózgu (MCAO). U szczurów z nadekspresją PEDF autorzy zaobserwowali ograniczenie degeneracji neuronów i astrocytów w rejonie uszkodzenia, co skutkowało zmniejszeniem obszaru lezji. Ponadto, w komórkach prążkowania tych zwierząt stwierdzono znacznie mniejszą ekspresję genów czynników prozapalnych niż u zwierząt kontrolnych.

Rzęskowy czynnik neurotroficzny (CNTF) wykazuje bardzo niską ekspresję w OUN, głównie w astrocytach (Dallner i wsp., 2002). Aktywność CNTF w prążkowie myszy zwiększa się dwukrotnie w pierwszej godzinie po ischemii, osiągając 30-krotny wzrost w ciągu 2 tygodni (Kang i wsp., 2012). Lokalizacja specyficznych receptorów CNTFR- $\alpha$  w strefie SVZ u dorosłych zwierząt sugeruje potencjalną rolę CNTF w neurogenезie (Emsley i Hagg, 2003). U genetycznie modyfikowanych myszy pozbawionych CNTF nie obserwuje się proliferacji komórek w rejonie SVZ w eksperymentalnym modelu ischemii mózgu (Leibinger i wsp., 2009; Kang i wsp., 2013). Podanie CNTF do mózgu zwiększa wbudowanie BrdU do progenitorów neuralnych w SVZ i powoduje wzrost liczby komórek CNTFR- $\alpha^+$  i BrdU $^+$ . Jednocześnie obserwuje się wzrost liczby żywych neuronów w prążkowie 1-3 dni po reperfuzji i zmniejszenie liczby komórek apoptotycznych (kaspaza-3 $^+$ ) (Hermann i wsp., 2001; Yang i wsp., 2008; Muller i wsp., 2009). Rzęskowy czynnik neurotroficzny reguluje także neurogenезę w innych rejonach mózgu, takich jak zakręt zębaty hipokampa (Muller i wsp., 2009) czy podwzgórze (Kokoeva i wsp., 2005).

Niedawno opisano dwa nowe białka wykazujące właściwości neuroprotekcyjne: śródmózgowy czynnik neurotroficzny pochodzenia astrocytarnego (MANF) oraz mózgowy dopaminowy czynnik neurotroficzny (CDNF). Właściwości biologiczne tych czynników po raz pierwszy stwierdzono w eksperymentalnym modelu choroby Parkinsona u szczura. Śródmózgowy czynnik neurotroficzny pochodzenia astrocytarnego (MANF) wykazuje ekspresję w astrocytach i neuronach. W mózgu najwyższy jego poziom stwierdzono w korze mózgowej i hipokampie (Airavaara i wsp., 2010). Dystrybucja czynnika CDFN w OUN jest podobna jak w przypadku MANF. Dodatkowo, ekspresję CDFN odnotowano w śródmózgowiu, prążkowie i istocie czarnej (Sun i wsp., 2011). Zarówno MANF jak i CDFN znane są ze swoich właściwości ochronnych i regeneracyjnych w stosunku do neuronów dopaminergicznych. Mózgowy dopaminowy czynnik neurotroficzny zastosowany w terapiach eksperymentalnych jest tak samo skuteczny jak GDNF, odznacza się jednak większą specyficznością wobec neuronów dopaminergicznych (Lindholm i wsp., 2007). Badania przeprowadzone w eksperymentalnym modelu ischemii mózgu wykazały wzrost ilości wydzielanego do przestrzeni zewnątrzkomórkowej czynnika MANF (Tadimalla i wsp., 2008). Airavaara (2009) zaobserwował, że podanie do kory mózgu wektora kodującego białko MANF powodowało zmniejszenie obszaru uszkodzenia powstałego w wyniku MCAO i jednoczesny spadek liczby komórek TUNEL-pozytywnych w niedotlenionej korze. Ten sam zespół badaczy opisał pozytywne działanie MANF u zwierząt poddanych MCAO, co skutkowało szybszym przywróceniem utraconych funkcji motorycznych (Airavaara i wsp., 2010).



Niezależnie od „klasycznych” czynników neurotroficznych, także inne substancje wykazują pozytywne działanie na wzrost, proliferację i dojrzewanie komórek neuralnych. Należą do nich m.in. naskórkowy czynnik wzrostu (EGF, *epidermal growth factor*), czynnik wzrostu fibroblastów-2 (FGF-2, *fibroblast growth factor*), insulino-podobny czynnik wzrostu-1 (IGF-1, *insulin-like growth factor-1*), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF, *hepatic growth factor*), erytropoetyna (EPO, *erythropoietin*), trombopoetyna (TPO, *thrombopoietin*), czynnik stymulujący wzrost kolonii granulocytów (G-CSF, *granulocyte-colony stimulating factor*), naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF, *vascular-endothelial growth factor*). Szereg z tych substancji podanych *in vivo* reguluje procesy neuroregeneracji. W badaniach *in vitro* wykazano ich działanie stymulujące proliferację komórek macierzystych i progenitorowych oraz utrzymywanie ich w stanie niezróżnicowanym.

W krótkim czasie po niedokrwieniu wzrasta ekspresja genów dla EGF i FGF-2 w uszkodzonym rejonie mózgu (Endoh i wsp., 1994; Lin i wsp., 1997; Hayashi i wsp., 2003). Czynniki te mają właściwości mitogenne, promują wytwarzanie nowych neuronów, zwiększając pulę komórek macierzystych w strefie SVZ u dorosłych gryzoni (Kuhn i wsp., 1997; Zheng i wsp., 2004). Jednocześnie obserwowano wzrost ekspresji receptorów dla EGF i FGF na komórkach progenitorowych (Ninomiya i wsp., 2006). Myszy pozbawione genu kodującego FGF-2 wykazują zmniejszoną proliferację progenitorów neuralnych po ischemii (Yoshimura i wsp., 2001). W badaniach z użyciem wektorów wirusowych zaprogramowanych do długotrwałego dostarczania zwierzętom FGF-2 obserwowano wzrost neurogenezy po niedokrwieniu mózgu przez 3 miesiące, co może świadczyć o udziale tego czynnika w długofalowych procesach naprawczych mózgu (Watanabe i wsp. 2004, Leker i wsp., 2007). Podobny efekt działania wykazuje EGF. Podanie mieszaniny tych dwóch czynników powoduje istotny statystycznie wzrost liczby proliferujących komórek w strefach SVZ i SGZ u zwierząt poddanych niedokrwieniu w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. Dodatkowo, zaobserwowano wzrost przeżycia nowopowstałych komórek neuralnych w porównaniu z grupą kontrolną (Tureyen i wsp., 2005; Baldauf i Reymann, 2005).

Insulino-podobny czynnik wzrostu-1 (IGF-1), produkowany głównie w wątrobie i w mózgu, jest najlepiej scharakteryzowanym mediatorem hormonalnej regulacji wzrostu z uwagi na istotną rolę, jaką odgrywa w regulacji procesu wzrostu tkanek. Nie wiadomo jakie znaczenie ma IGF-1 obecny w surowicy, natomiast jego multipotencjalne właściwości neuroprotektoryjne w stosunku do komórek OUN zostały potwierdzone w badaniach *in vitro* i *in vivo* (Guan i wsp., 1996; Johnston i wsp., 1996; Schabitz i wsp., 2001; Guan i wsp., 2001; Rizk i wsp., 2007). Insulino-podobny czynnik wzrostu może stymulować proliferację komórek progenitorowych. Neutralizacja IGF-1 poprzez podanie do komór bocznych przeciwciała wiążącego ten czynnik, istotnie zmniejszała indukowaną niedokrwieniem proliferację neuralnych komórek progenitorowych (Yan i wsp., 2006). Co ciekawe, IGF-1 promuje proliferację komórek tylko w obecności FGF-2, jednocześnie wzmacniając jego efekt mitogeny (Kalluri i wsp., 2007). Sugeruje się że IGF-1 odpowiada za wydłużenie czasu przeżycia nowopowstałych komórek, umożliwiając działanie innych czynników wzrostowych odpowiedzialnych za zwiększenie proliferacji (Dempsey i wsp., 2003). Usunięcie FGF-2 stymuluje proces różnicowania prekursorów neuralnych, co świadczy o udziale IGF-1 w regulacji poszczególnych etapów procesu neurogenezy.

Czynnik wzrostu hepatocytów (HGF) jest wielofunkcyjnym czynnikiem pierwotnie zidentyfikowanym jako mitogen dla hepatocytów. Podobnie jak inne cytokiny, ograniczając procesy ekscytotoksyczności, wykazuje działanie protekcyjne. Obserwacje z badań *in vitro* i *in vivo* ujawniły jego funkcje anty-apoptotyczne w stosunku do komórek nerwowych. Oprócz

wzrostu ekspresji HGF obserwowano obniżenie liczby neuronów kaspazo-pozytywnych i jednocześnie zwiększenie udziału komórek prezentujących obecność Bcl-2 (Tsuzuki i wsp., 2000). W mózgu opisano jego pozytywne działanie regulujące migrację neuroblastów, angiogenezę, różnicowanie progenitorów neuronalnych i wzrost neurytów (Shang i wsp., 2011). W modelach eksperymentalnych ischemii mózgu, HGF podany do komórek bocznych lub do mózgu powodował zmniejszenie obszaru uszkodzenia i promował przeżycie nowopowstałych komórek nerwowych (Kadoyama i wsp., 2007). Wydaje się, że podobnie jak IGF-1, czynnik wzrostu hepatocytów wywiera efektywne działanie jedynie w obecności innych czynników neurotroficznych np. GDNF.

Erytropoetyna (EPO) stymuluje dojrzewanie, różnicowanie i przeżywalność progenitorów hematopoetycznych. Ekspresja EPO i jej receptorów (EPO-R) w mózgu oraz zwiększenie aktywności erytropoetyny w neuronach, neuralnych komórkach progenitorowych, komórkach glejowych i komórkach śródbłonna naczyń mózgowych u szczurów po ischemii świadczy o udziale EPO w procesach zachodzących w komórkach OUN. Badania nad mechanizmami hipoksji wykazały wzrost ekspresji EPO oraz jej receptorów w OUN (Ehrenreich i wsp., 2004). Erytropoetyna działa protekcyjnie na neurony w warunkach hipoksji, ischemii i wynikającego z nich stresu metabolicznego (Bernaudin i wsp., 1999; Eid i wsp., 2004). Wspomaga regenerację aksonów (Toth i wsp., 2008). Ponadto ułatwia migrację neuroblastów do miejsca uszkodzenia (Tsai i wsp., 2006). Jej działanie anty-apoptotyczne w stosunku do neuronów izolowanych z kory i hipokampa wykazano w badaniach *in vitro* (Lewczuk i wsp., 2000; Sinor i wsp., 2000). Trombopoetyna, w przeciwieństwie do EPO, pobudza apoptozę i hamuje różnicowanie neuronalne powstałych prekursorów neuralnych (Samoylenko i wsp., 2008).

Spośród innych czynników hematopoetycznych aktywność neuroprotekcijną wykazuje G-CSF. Produkowany jest przez aktywowane monocyty w odpowiedzi na cytokiny prozapalne, ale także przez komórki śródbłonna, fibroblasty i płytki krwi. Czynnikiem stymulującym wzrost kolonii granulocytów powoduje mobilizację komórek macierzystych ze szpiku do krwi (Lanfranconi i wsp., 2011). Właściwości regeneracyjne G-CSF opisano w uszkodzonej tkance nerwowej mózgu i rdzenia kręgowego (Schneider i wsp., 2005). Ekspresję receptora dla G-CSF stwierdzono w różnych rejonach OUN. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że G-CSF uwalniany w OUN w odpowiedzi na niedotlenienie mózgu, wiąże się z receptorami, których ekspresję obserwuje się po udarze w rejonie penumbry, działając anty-apoptotycznie zwiększa przeżycie neuronów w obszarze uszkodzenia (Schäbitz i wsp., 2003; Schneider i wsp., 2005). Indukuje różnicowanie progenitorów neuralnych i wzrost neurytów, promuje zachowanie szlaków nerwowych, co wykazano w eksperymentalnym modelu uszkodzenia rdzenia kręgowego (Pitzer i wsp., 2010).

Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) jest jednym z najczęściej badanych czynników mających właściwości promujące neurogenezę u dorosłych zwierząt. Systemowe podanie VEGF powoduje wzrost proliferacji komórek w strefie SVZ (Jin i wsp., 2002). U myszy z nadekspresją VEGF-A obserwuje się wzrost receptorów VEGFR1 i VEGFR2, odpowiedzialnych za proliferację i zwiększenie przeżycia nowopowstałych komórek (Wittko i wsp., 2009). Wzrost stężenia VEGF przyspiesza migrację progenitorów neuronalnych do miejsc uszkodzenia w modelach ischemii mózgu gryzoni (Wang i wsp., 2007). Z kolei myszy z delecją genu VEGF-B wykazują znaczny spadek neurogenety i zmniejszenie liczby neuroblastów w rejonie opuszki węchowej (Sun i wsp., 2006). Dokomorowe podanie VEGF-B u tych zwierząt powoduje przywrócenie neurogenety do poziomu obserwowanego u zwierząt typu dzikiego, co potwierdza jego pozytywne działanie neurogenne.

### 1.3.3. Proces angiogenezy po ischemii mózgu

Istotą endogennych procesów naprawczych jest nie tylko zwiększenie proliferacji i migracji progenitorów neuralnych z rejonów neurogennych mózgu, ale również stymulacja procesu angiogenezy, mającego za zadanie przywrócenie ukrwienia w niedotlenionej tkance. Neurogeneza i angiogeneza są ze sobą integralnie związane (Lin i wsp., 2000; Greenberg i wsp., 2005; Teng i wsp., 2008).

Proces tworzenia naczyń krwionośnych w następstwie ischemii zachodzi na drodze angiogenezy przez rozrost istniejących w tkance naczyń lub powstawania nowych struktur poprzez produkcję komórek śródbłonna „*de novo*” z komórek prekursorowych (angioblastów) (Rissau, 1997). Proliferacja komórek śródbłonna w tkance otaczającej obszar uszkodzenia widoczna jest 12-24 godzin po udarze, aktywny proces tworzenia naczyń u ludzi ma miejsce 3-4 dni po ischemii (Beck i wsp., 2009). Obecne w krwi progenitory komórek śródbłonna (EPC, *endothelial progenitor cells*) uwalniane ze szpiku kostnego mogą odgrywać ważną rolę w endogennych procesach reparacji sieci naczyń krwionośnych po ischemii mózgu (Yamashita i wsp., 2012). Mobilizacja EPC ze szpiku następuje pod wpływem działania czynników w tym: czynnika indukowanego hipoksją (HIF-1, *hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$* ), VEGF oraz erytropoetyny, produkowanych i uwalnianych do krwi obwodowej w odpowiedzi na niedotlenienie (Hoenig i wsp., 2008). W następstwie udaru, EPC migrują do uszkodzonych tkanek gdzie różnicują się w dojrzałe komórki śródbłonna, będąc bezpośrednio zaangażowanymi w tworzenie nowych naczyń (*vasculogenesis*) lub mogą być źródłem czynników, pośrednio promując angiogenezę (Asahara i wsp., 1999; Liman i wsp., 2012). W krótkim czasie po ischemii, obserwuje się zwiększenie ekspresji genów typowych dla procesu angiogenezy z jednoczesnym wzrostem specyficznych białek w rejonie uszkodzenia mózgu (Krupinski i wsp., 1997). Czynnikiem najbardziej zaangażowanym w indukcję procesu angiogenezy są: VEGF, FGF-2, BDNF, angiopoetyna-1 i -2 (Hermann i wsp., 2009; Ergul i wsp., 2012). Po udarze w uszkodzonej tkance obserwuje się zwiększoną ekspresję genów czynników związanych z procesem angiogenezy w tym VEGF, FGF-2, EGF (Hayashi i wsp., 2003). VEGF jest substancją wielofunkcyjną, która ma znaczenie w naczyniowej regulacji szeregu procesów fizjologicznych w różnych narządach. Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu występuje w mózgu, głównie w komórkach nabłonkowych spłotu naczyniówkowego, astrocytach i neuronach. Wzrost ekspresji VEGF i jego receptorów, VEGFR-1 i VEGFR-2, w okolicach uszkodzenia obserwowano 6 godzin po ischemii mózgu u szczurów (Martí i wsp., 2000). Myszy z nadekspresją ludzkiego rekombinowanego VEGF-165 poddane ischemii mózgu charakteryzowały się wzmożonym procesem angiogenezy i większą gęstością naczyń włosowatych w okolicy uszkodzenia. Liczne badania eksperymentalne potwierdziły pozytywny efekt VEGF na tworzenie sieci naczyń krwionośnych w mózgu po niedokrwieniu (Lanfranconi i wsp., 2011). Wraz ze wzrostem VEGF notowano zwiększenie ekspresji mRNA Ang-1 i Ang-2, które odgrywają rolę w modelowaniu łożyska naczyniowego po ischemii, dodatkowo powodują uszkodzenie bariery krew-mózg. Wzrost Ang-1 i receptorów Tie-2 był widoczny w okolicy uszkodzenia 2-28 dni po ischemii w sąsiedztwie nowopowstałych naczyń krwionośnych (Zhu i wsp., 2005).

Z najnowszych badań wynika, że naczynia krwionośne w rejonie SVZ odgrywają istotną rolę w procesie regeneracji neuronów zniszczonych po niedokrwieniu mózgu (Mirzadeh i wsp., 2008; Shen i wsp., 2008; Tavazoie i wsp., 2008). Komórki śródbłonna stanowiące integralną część niszy mają wpływ na funkcje neuralnych komórek macierzystych i ich progenitorów (Leventhal i wsp., 1999; Palmer i wsp., 2000). Uwalniają szereg czynników neurotroficznych w

tym m.in. BDNF i VEGF, które stymulują odnowę neuralnych komórek macierzystych, promują wytwarzanie prekursorów neuronalnych oraz hamują ich różnicowanie. Wyniki badań *in vitro*, których przedmiotem były współhodowle komórek śródbłonka naczyń mózgowych izolowanych z miejsc uszkodzenia tkanki po ischemii mózgu i progenitorów neuralnych pobranych z rejonów SVZ zdrowych zwierząt wykazały wzrost proliferacji tych komórek i ich różnicowanie w kierunku neuronalnym (Teng i wsp., 2008). Po ischemii mózgu obserwuje się migrację neuroblastów do granicy uszkodzonej tkanki. Komórki tworzą struktury przypominające łańcuchy charakterystyczne dla tych obserwowanych w donosowym strumieniu migracji (RMS, *rostral migratory stream*), a droga migracji neuroblastów jest ściśle powiązana z naczyniami krwionośnymi (Jiang i wsp., 2005; Yamashita i wsp., 2006). Migracja neuroblastów jest kontrolowana przez czynnik pochodzenia komórek podścieliska-1 $\alpha$  (SDF-1 $\alpha$ , *stromal derived factor 1 $\alpha$* ) i angiopoetynę-1 (Ang-1, *angiopoietin-1*) wydzielane przez aktywowane śródbłonki naczyń mózgowych, które są atraktantami dla neuroblastów posiadających na swojej powierzchni specyficzne dla SDF-1 $\alpha$  receptory CXCR4, a dla Ang-1 receptory Tie-2. Blokowanie CXCR4 ogranicza migrację neuroblastów do uszkodzonej tkanki nerwowej (Imitola i wsp., 2004; Robin i wsp., 2006). Badania *in vivo* mające na celu zahamowanie angiogenezy poprzez dokomorowe podanie przeciwciał neutralizujących receptor angiopoetyny Tie-2 lub systemowa infuzja endostatyny powoduje ograniczenie migracji nowopowstałych w strefie SVZ neuroblastów do miejsc uszkodzenia po ischemii mózgu (Ohab i wsp., 2006). Co ciekawe, progenitory neuralne izolowane z rejonów SGZ mózgu zwierząt po ischemii stymulują angiogenezę *in vitro* mierzoną w teście tworzenia naczyń (*capillary-like tube formation*). Odpowiedzialnym za to wydaje się VEGF, ponieważ blokowanie receptora VEGF-R2 hamuje ten efekt (Teng i wsp., 2008).

Reasumując, po ischemii mózgu proces angiogenezy stwarza atrakcyjne mikrośrodowisko dla nowopowstałych neuroblastów powodując ich migrację do rejonu uszkodzenia, a te z kolei stymulują tworzenie nowych naczyń krwionośnych. Ponadto, aktywowane komórki śródbłonka naczyń stymulują *in situ* proliferację neuroblastów (Zhang i wsp., 2007).

## 1.4. Próby terapii udaru mózgu

### 1.4.1. Terapia farmakologiczna

Jedyną, jak do tej pory, substancją dopuszczoną do leczenia chorych po udarze mózgu jest rekombinowany tkankowy aktywator plazminogenu (rtPA) (Eckert, 2009). Endogenny aktywator plazminogenu (tPA) jest wydzielaną przez śródbłonek proteazą serynową powodującą przekształcenie plazminogenu w plazminę. W 1996 roku rtPA został zatwierdzony jako lek stosowany w ostrym udarze. Pierwsze badania kliniczne wykazały poprawę upośledzonych w wyniku udaru funkcji motorycznych u pacjentów poddanych terapii. Jednak późniejsza analiza wyników ujawniła, że efekt ten był mniej korzystny w porównaniu z przewidywanymi (Frey, 2005). Ponadto, terapia z zastosowaniem rtPA ma pewne ograniczenia, przede wszystkim bardzo wąskie, 3-godzinne, okno terapeutyczne. Obserwowane są również skutki uboczne np. krwotok wewnątrzczaszkowy, wzrost produkcji wolnych rodników czy wystąpienie ponownego udaru (Marler, 2003). Ponadto, wykazano również, że rtPA może dodatkowo prowadzić do spotęgowania ekscytotoksycznej śmierci neuronów (Tsirka, 1997). Dlatego prowadzi się intensywne badania nad poszukiwaniem substancji odpowiedzialnej za ochronę komórek nerwowych po niedotlenieniu mózgu.

Jednym z mechanizmów prowadzących do śmierci komórek w wyniku niedotlenienia jest zaburzenie homeostazy wapniowej w neuronach. Zmiany te spowodowane są zbyt dużą aktywacją receptorów glutaminergicznych oraz kanałów wapniowych zależnych od napięcia (VDCC). Stosowanie związków blokujących receptory glutaminergiczne (MK-801) lub napięciozależne (nimodipina) u zwierząt eksperymentalnych z wywołanym niedokrwieniem mózgu skutkowało poprawą utraconych funkcji motorycznych (Inzitari i wsp., 2005). Co prawda w połowie lat 80-tych XX wieku rozpoczęto próby kliniczne z zastosowaniem Nimodipiny, ale z grupy 14 pacjentów tylko u 4 odnotowano poprawę stanu zdrowia, w przypadku 9 chorych nie wykazano żadnego efektu, a w jednym przypadku zaobserwowano pogorszenie ogólnego stanu zdrowia (Danton i wsp., 2004). Eksperymenty medyczne przeprowadzone z drugim inhibitorem receptorów VDCC, flunaryzyną, nie przyniosły żadnych istotnych efektów leczenia (Cohan, 1990).

Skutecznej terapii poszukiwano również wśród związków przeciwdziałających kaskadzie ekcytotoksycznej. Szereg substancji działających na receptory glutaminergiczne zostało przetestowane zarówno w eksperymentalnym modelu udaru MCAO u gryzoni jak i u pacjentów z niedokrwieniem. Antagonista receptora NMDA (MK-801), zastosowany po niedokrwieniu mózgu u zwierząt spowodował ok. 75% zmniejszenie obszaru uszkodzenia (Schurr, 2004). Mimo, że w badaniach eksperymentalnych wykazano ochronne działanie zarówno MK-801 jak i innego antagonisty receptorów NMDA Dekstrometofanu, pierwsze próby kliniczne zostały wstrzymane z powodu psychodelicznych efektów ubocznych tych substancji i braku pozytywnych efektów działania (Kermer i wsp., 1999). Wykonano badania także innych związków niebędących antagonistami NMDA. Jednym z takich związków dopuszczonych do drugiej fazy badań klinicznych jest Zonampanel, który jest antagonistą receptorów AMPA (Legos i wsp., 2003).

Tworzenie się wolnych rodników, zarówno w rejonie uszkodzenia jak i strefie półcienia, w następstwie niedokrwienia odpowiada za dużą część uszkodzeń powstających w mózgu. Wiele czynników blokujących powstawanie wolnych rodników zostało przetestowanych u zwierząt w modelach niedokrwienia mózgu. Jednym z nich jest kwas moczowy, naturalny antyoksydant obecny w tkankach i płynach ciała. Podawanie kwasu moczowego zwierzętom poddanym niedotlenieniu powodowało istotne zmniejszenie wielkości uszkodzenia oraz znaczną poprawę funkcji motorycznych (Yu i wsp., 1998). Podobne obserwacje w eksperymentalnym modelu udaru mózgu u gryzoni uzyskano stosując inne inhibitory wolnych rodników m.in. FR210575, NXY59 czy Edarawon (Sydserff i wsp., 2002; Iwashita i wsp., 2003). Jednak pomimo zachęcających wyników badań u zwierząt tylko w nielicznych przypadkach działanie to zostało potwierdzone u ludzi. Neutralizator wolnych rodników NXY-59 jest jednym ze związków, który został dopuszczony do prób klinicznych. Mimo początkowych doniesień o skutecznym przeciwdziałaniu uszkodzeniu mózgu po niedokrwieniu (Lees i wsp., 2006), kolejny etap badań przeprowadzony w większej grupie pacjentów nie potwierdził tego wyniku (Shuaib i wsp., 2007). Opisany związek o działaniu przeciwzapalnym wyizolowany z Ginkgo, EGb-761 (Legos i wsp., 2002), znajduje się w aktualnie w III fazie badań klinicznych.

Kolejna grupa związków przebadanych pod względem zapobiegania uszkodzeniu komórek nerwowych po udarze to substancje o działaniu przeciwzapalnym. Proces zapalny może mieć dwójaki udział w powstawaniu uszkodzenia po udarze. Pierwszym z nich jest tworzenie agregatów komórek układu odpornościowego wewnątrz naczyń krwionośnych, co uniemożliwia całkowity powrót ukrwienia w miejscu niedokrwienia. Drugi z mechanizmów dotyczy produkcji cytokin zapalnych oraz wolnych rodników bezpośrednio w miejscu uszkodzenia (Arumugam i wsp., 2005; Yilmaz i wsp., 2010). Jednym z możliwych mechanizmów modulowania reakcji

zapalnej po niedokrwieniu jest modyfikowanie molekuł adhezyjnych takich jak selektyny czy integryny, zaangażowanych w migrację komórek immunologicznych. Zastosowanie przeciwciała blokującego selektyny powodowało u myszy ograniczenie wielkości uszkodzenia po niedotlenieniu mózgu do 70% (Goussev i wsp., 1998). Również przeciwciała anti-ICAM-1 zmniejszały wielkość obszaru lezji po tymczasowym niedokrwieniu (Zhang i wsp., 1995). Jednak późniejsze próby kliniczne z użyciem mysiego przeciwciała anti-ICAM-1, Enlimomabu, spowodowały pogorszenie stanu ogólnego pacjentów, a nawet wzrost śmiertelności. To niekorzystne działanie było prawdopodobnie wynikiem zastosowania przeciwciała pochodzącego od innego gatunku (Furuya i wsp., 2001). Prowadzone były także próby kliniczne z użyciem przeciwciała wiążącego białka CD11b/CD18. Faza II badań wykazała, że związek ten jest bezpieczny i dobrze tolerowany przez pacjentów (Krams i wsp., 2003). Pozytywne wyniki w badaniach na zwierzętach przyniosło użycie inhibitora kinazy aktywowanej mitogenem (MAPK). Zablokowanie tej ścieżki sygnałowej powoduje zmniejszenie ilości produkowanych cytokin, ograniczenie obszaru uszkodzenia oraz poprawę motoryczną u szczurów poddanych ogniskowemu niedotlenieniu mózgu. Terapia z zastosowaniem MAPK jest w trakcie testów klinicznych w celu sprawdzenia jej zdolności do ograniczania procesów zapalnych u chorych z udarem (Barone i wsp., 2001). Badano także inhibitory chemokin, cytokiny przeciwzapalne i przeciwciała blokujące różne mediatory zapalenia (Beech i wsp., 2001), jednak mimo pozytywnych wyników badań eksperymentalnych żadna z tych koncepcji nie sprawdziła się w badaniach u pacjentów.

#### 1.4.2. Terapia z udziałem czynników neurotroficznych

Stosowanie w badaniach eksperymentalnych u zwierząt w modelach ischemii mózgu hematopoetycznych czynników wzrostu takich jak: EPO, G-CSF, GM-CSF, VEGF, czynnik komórek macierzystych (SCF, *stem cell factor*) a także neurotrofin: BDNF, GDNF, FGF-2, IGF-1 poprawiało stan kliniczny zwierząt, ograniczając obszar uszkodzenia. Wyniki badań przedklinicznych z użyciem czynników wzrostu ujawniły zwiększenie procesów naprawczych w uszkodzonym mózgu, stymulację neurogenezy i angiogenezy (Kaushansky i wsp., 2006). Podobnie, wstępne próby kliniczne wykazały pozytywne działanie niektórych egzogennych czynników troficznych podawanych pacjentom po udarze w postaci zmniejszenia deficytów motorycznych.

Zdolność przechodzenia przez barierę krew-mózg stanowi o przydatności EPO w ewentualnej terapii chorób OUN. Szczególne zainteresowanie budzi karbonylowana forma EPO. Tak zmodyfikowana erytropoetyna ma działanie neurotroficzne, natomiast nie przejawia aktywności hematopoetycznej. Od 1998r. przeprowadzono blisko 200 badań przedklinicznych wykazujących neuroprotektoryjne działanie EPO w różnych schorzeniach OUN, w tym niedotlenieniu i urazie mózgu, a także chorobach neurodegeneracyjnych. Podanie EPO prowadzi do zwiększenia intensywności procesów naprawy mózgu oraz poprawy funkcjonalnej, co opisano w zwierzęcym modelu ostrego niedotlenienia mózgu oraz w szczurzym modelu niedotlenienia okołoporodowego (Wang i wsp., 2004; Wei i wsp., 2006).

Pierwsza próba kliniczna z użyciem EPO („Gottingen EPO Stroke Study”), przeprowadzona w grupie 53 pacjentów, polegała na dożylnym 3-krotnym podaniu rekombinowanej ludzkiej erytropoetyny (rhEPO) < 8, 24 i 48 godz. od momentu wystąpienia objawów udaru (Ehrenreich i wsp., 2002). Pozytywne wyniki badań (poprawa stanu neurologicznego, zmniejszenie obszaru uszkodzenia oceniane w MR, spadek białka S-100β w surowicy krwi) stały się podstawą do rozpoczęcia w 2003r. wieloośrodkowych prób klinicznych („German Multicenter EPO Stroke

Trial”) (NCT00604630), przeprowadzonych w grupie ponad 500 pacjentów. Opublikowane wyniki badań potwierdziły wcześniejsze obserwacje bezpiecznego i skutecznego zastosowania EPO (Siren i wsp., 2009). Obecnie badania kliniczne II fazy z zastosowaniem EPO i G-CSF (NCT00298597), oraz kolejne dwie próby podawania EPO z ludzką gonadotropiną kosmówkową (hCG, *human chorionic gonadotropin*) (NCT00715364; NCT00663416) są w toku. Z uwagi na wysoki hematokryt u pacjentów poddanych leczeniu, spowodowany prawdopodobnie działaniem hematopoetycznym EPO, w kolejnych próbach klinicznych zastosowano karbonylowy analog erytropoetyny (CEPO), który okazał się tak samo efektywny jak EPO, bez objawów ubocznych powodujących zmiany obrazu krwi (NCT00870844). Badania kliniczne III fazy z wykorzystaniem EPO o przedłużonym działaniu (Darbepoetyna- $\alpha$ ) u chorych po udarze mózgu są w toku (NCT00375869).

Czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF) to glikoproteina odpowiedzialna za promowanie różnicowania komórek progenitorowych w granulocyty. Stosowana jest już od dawna w klinice w leczeniu neutropenii oraz w celu mobilizacji komórek macierzystych ze szpiku do krwi przy przeszczepach (Schneider i wsp., 2005). W eksperymentalnych modelach uszkodzenia mózgu po podaniu G-CSF obserwowano działanie neuroprotektcyjne, widoczne poprzez aktywację różnych procesów, w tym indukcję ścieżek antyapoptotycznych (Solaroglu i wsp., 2006), zmniejszenie odpowiedzi immunologicznej, stymulację procesów neurogenezy i angiogenezy (Sehara i wsp., 2007), wzrost proliferacji komórek progenitorowych w SVZ i SGZ oraz mobilizację komórek macierzystych z krwi i zwiększenie ich przechodzenia do mózgu (Shyu i wsp., 2004). Pomimo, że istnieją doniesienia o upośledzeniu przez G-CSF funkcji motorycznych (Taguchi i wsp., 2007) oraz o braku jego działania po aplikacji w przewlekłej fazie udaru (Zhao i wsp., 2007) i modelach całkowitego niedotlenienia mózgu (Matchett i wsp., 2007) obecne są liczne dane literaturowe mówiące o pozytywnym działaniu tego czynnika.

Pozytywne działania G-CSF u zwierząt eksperymentalnych pozwoliły na wprowadzenie G-CSF do I/II fazy badań klinicznych. Do pierwszej próby klinicznej („*The Stem Cell Trial of Recovery Enhancement*”) zakwalifikowano 36 chorych, 7-30 dni od momentu wystąpienia udaru, którym podskórną podano rhG-CSF (Sprigg i wsp., 2006). Efektywność działania G-CSF mierzono liczbą krążących we krwi progenitorów hematopoetycznych. Wstępne wyniki badań wykazały dobrą tolerancję na lek, zwiększoną mobilizację komórek CD34<sup>+</sup> ze szpiku do krwi, natomiast u chorych nie stwierdzono poprawy objawów neurologicznych (NCT16784092). Kolejna próba kliniczna przeprowadzona na Tajwanie, w której zastosowano G-CSF u 10 pacjentów we wczesnym okresie < 7 dni po udarze potwierdziła bezpieczeństwo stosowania G-CSF (Shyu i wsp., 2006). Po 12 miesiącach obserwacji stwierdzono u chorych nieznaczną poprawę funkcjonalną według skali NIHSS (*National Institute of Health Stroke Scale*) i ESS (*European Stroke Scale*). Pozytywny efekt działania G-CSF potwierdziły badania aktywności metabolicznej mózgu PET (poziom wychwyty fluorodeoksyglukozy) i MRI. Podanie G-CSF we wczesnym etapie choroby < 24 godz. od czasu wystąpienia objawów udaru dawało lepsze wyniki, w dużym stopniu redukując niesprawność ruchową pacjentów. Podobne wyniki badań opisano w grupie 45 chorych po udarze, z których 15 osób otrzymało podskórną iniekcję rhG-CSF w dawce 2g/kg przez 5 dni (Zhang i wsp., 2006). Poprawa motoryczna u chorych była widoczna 3 tygodnie po zastosowaniu terapii, nie stwierdzono działań ubocznych G-CSF. Obecnie trwają próby kliniczne II i III fazy, w których podawany jest G-CSF (NCT00809549) (Schäbitz i wsp., 2001) lub G-CSF wraz z EPO (NCT00298597) (Lanfranconi i wsp., 2011).

Czynnik wzrostu fibroblastów (FGF-2) występuje w wielu tkankach, ma wpływ na aktywność mitotyczną komórek, powoduje rozszerzenie naczyń. Jest najsilniej działającym czynnikiem

neurotroficznym spośród rodziny FGF, wykazuje działanie mitogenne, stymulując neurogenezę (Wada i wsp., 2003). U szczurów pozbawionych genu FGF-2 liczba komórek progenitorowych w strefie SVZ jest o 50% niższa w porównaniu ze zwierzętami dzikimi (Zheng i wsp., 2004). Po dożylnym podaniu u zwierząt w modelach udaru mózgu obserwuje się ograniczenie obszaru uszkodzenia mózgu (Kawamata i wsp., 1997; Deguchi i wsp., 2000). Mechanizm tego działania nie został jak dotąd poznany, choć wydaje się, że polega na bezpośrednim działaniu cytoprotekcyjnym na komórki w rejonie penumbry. Co ciekawe, podanie FGF-2 do komórek bocznych szczura po ischemii przyspiesza różnicowanie progenitorów neuralnych oraz wspomaga synaptogenezę (Ay i wsp., 1999; Wada i wsp., 2003).

Pomimo pozytywnych wyników uzyskanych w badaniach przedklinicznych na zwierzętach, u których zastosowano różne modele udaru mózgu w klinice podjęto tylko dwie próby terapii z zastosowaniem FGF-2. Próby kliniczne II/III fazy przeprowadzone w USA w grupie 300 pacjentów zostały wstrzymane z powodu dużej śmiertelności chorych, którym podano FGF-2 w porównaniu z grupą kontrolną (FIBLAST, 1998; Wahlgren i wsp., 2004). Wieloośrodkowe badania II/III fazy przeprowadzone w Europie i Australii w grupie 286 pacjentów z ostrym udarem mózgu potwierdziły wyniki uzyskane poprzednio przez grupę Wahlgren'a. Po podaniu dożylnie 5 -10 mg FGF-2 (Trafermina) nie obserwowano poprawy stanu neurologicznego pacjentów. Wśród objawów ubocznych działania FGF-2 widoczny był zależny od dawki spadek ciśnienia krwi i wzrost śmiertelności wśród osób badanych (Bogousslavsky i wsp., 2002).

Pozostałe czynniki takie jak: GM-CSF, VEGF, SCF, BDNF, IGF-1, GDNF, HB-EGF, które wykazują działanie neuroprotekcyjne i regeneracyjne po ischemii mózgu u zwierząt, nie znalazły zastosowania w próbach klinicznych. Możliwość implementacji tych czynników w terapii udaru mózgu u ludzi wymaga dodatkowych badań przedklinicznych i ustalenia protokołów ich bezpiecznego stosowania

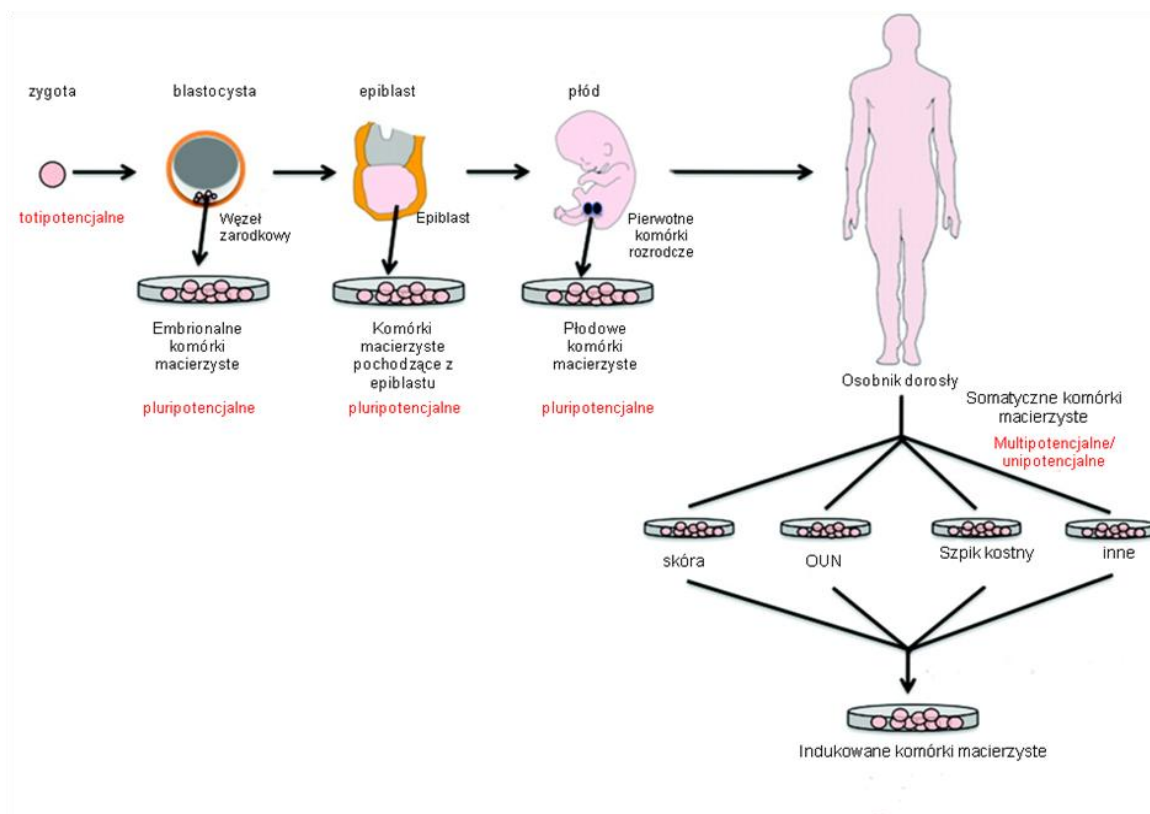
## 1.5. Terapia udaru mózgu z zastosowaniem przeszczepu komórek

### 1.5.1. Rodzaje i źródła komórek macierzystych stosowanych w terapii udaru mózgu

Możliwość wspomagania odnowy nieodwracalnie uszkodzonych struktur OUN za pomocą egzogennych komórek macierzystych pojawiła się z chwilą odkrycia neuralnych komórek macierzystych w mózgu dorosłych ludzi (Eriksson i wsp., 1998). Jeszcze w połowie ubiegłego wieku obowiązywał pogląd hiszpańskiego patologa, twórcy nowoczesnej neurobiologii, Santiago Ramon y Cayal, że „w mózgu człowieka drogi nerwowe są ustalone, wszystko musi umrzeć, nic się nie zregeneruje” (Ramon y Cayal, 1928). Historia badań neuralnych komórek macierzystych (NSC, *neural stem cells*) ma niespełna 20 lat, jednak szerokie zainteresowanie nie tylko z punktu widzenia mechanizmów neurogenezy, ale także poszukiwanie źródeł tych komórek poza OUN i aplikacji klinicznych jest przedmiotem wielu badań prowadzonych w ośrodkach na całym świecie.

Wśród komórek macierzystych stosowanych w eksperymentalnych modelach ischemii mózgu i u chorych po udarze przedmiotem badań były: pluripotencjalne komórki embrionalne, które mają zdolność różnicowania *in vitro* w komórki neuralne, multipotencjalne progenitory neuralne izolowane z mózgu płodów lub osobników dorosłych, komórki macierzyste i progenitorowe z innych tkanek organizmu takich jak: szpik kostny, krew obwodowa, tkanki popłodu, tkanka tłuszczowa, transformowane linie komórek neuralnych i indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (Quereshi i wsp., 2011).





Ryc.4. Schemat przedstawiający potencjalne źródła komórek macierzystych (Jaenisch, 2008)

Embrionalne komórki macierzyste (ESC, *embryonic stem cells*) są przedmiotem szczególnego zainteresowania biologów z uwagi na swoje właściwości nie limitowanej odnowy i zdolności różnicowania we wszystkie typy komórek (Domańska-Janik 2004; Kelly i wsp., 2004; Hayashi i wsp., 2006). Źródłem ESC są kilkudniowe zarodki w stadium blastocysty lub epiblastu. Odkrycie ESC u myszy (Evans i wsp., 1981, Martin, 1981), a następnie u człowieka (Thomson i wsp., 1998), stworzyło możliwości zastosowania tych komórek w terapii regeneracyjnej, ale także zrodziło wiele kontrowersji. Nieograniczony wzrost ESC *in vitro* z jednej strony zapewnia możliwość ich długotrwałej hodowli, podczas której w wyniku stałej replikacji można otrzymać dużą liczbę niezróżnicowanych komórek do eksperymentalnych i klinicznych aplikacji, z drugiej strony sposób pozyskiwania tych komórek z ludzkich zarodków budzi sprzeciw moralno-etyczno-prawny. Ponadto okazało się, że transplantacja ESC u zwierząt powoduje rozrost nowotworowy w postaci potworniaków (*teratoma*) lub bardziej złośliwych potworniako-raków (*teratocarcinoma*) (Thomson i wsp., 1998; Reubinoff i wsp., 2000; Knoepfler, 2009; Xi i wsp., 2010).

Z uwagi na ryzyko niekontrolowanej proliferacji ESC *in vivo* brak jest szeroko podejmowanych prób transplantacji tych komórek w modelach uszkodzenia mózgu u zwierząt. Niemniej jednak wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że przeszczepienie ESC myszy, małp lub człowieka do mózgu szczura po ischemii (układ ksenogeniczny) powoduje migrację komórek dawcy do miejsca uszkodzenia, ich różnicowanie w neurony i wbudowanie w struktury mózgu biorcy (Hoehn i wsp., 2002; Buhemann i wsp., 2006; Hayashi i wsp., 2006; Hicks i wsp., 2009; Daadi i wsp., 2009), podczas gdy ESC myszy przeszczepione w układzie syngenicznym pozostają w miejscu podania i tworzą teratocarcinoma (Erdö i wsp., 2003). Wyniki badań *in vitro* potwierdzają niebezpieczeństwo rozrostu nowotworowego ESC (Carson i wsp., 2006). Semiantore (2010) opisał hyperproliferyzację komórek neuralnych pochodzących z ESC po działaniu czynników produkowanych w mózgu po ischemii.

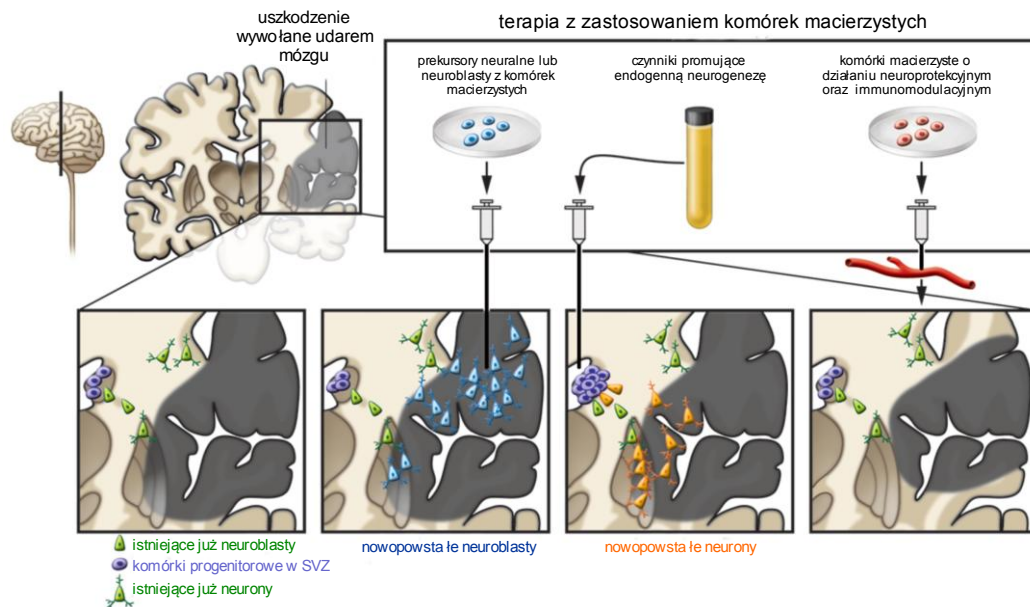
Neuralne komórki macierzyste (NSC, *neural stem cells*) znajdują się w niszach OUN (Reynolds i wsp., 1992; Doetsch i wsp., 1999; Sanai i wsp., 2004; Curtis i wsp., 2007; Riquelme i wsp., 2008), ale mogą także występować w innych rejonach mózgu (Mc Kay, 1997). Potencjalnym źródłem ludzkich NSC są tkanki płodu, mózgi dzieci i osób dorosłych. Neuralne komórki macierzyste mają zdolność samoodnowy, choć w warunkach *in vitro*, w odróżnieniu od ESC wykazują ograniczony potencjał replikacji, są multipotencjalne, różnicując się w trzy linie komórek neuralnych: neurony, astrocyty i oligodendrocyty (Reynolds i wsp., 1992; Mc Kay, 1997; Eriksson i wsp., 1998; Doetsch i wsp., 1999).

Neuralne komórki macierzyste izolowane z rejonów SVZ i SGZ przeszczepiane u gryzoni w eksperymentalnych modelach ischemii wykazywały pozytywne działanie poprawiając stan ogólny zwierząt. Progenitory neuralne izolowane z hipokampa szczura, podawane 14 dni po całkowitej ischemii różnicowały się w neurony i astrocyty, wbudowując się w struktury hipokampa syngenicznych biorców. Transplantacja NSC ograniczała deficyty wywołane uszkodzeniem mózgu, co wykazano w testach behawioralnych (funkcje pamięci i uczenia się) (Toda i wsp., 2001). Podobnie inne próby przeszczepiania NSC u zwierząt po udarze wykazały pozytywny wpływ komórek na przywrócenie upośledzonych funkcji poznawczych i ruchowych (Zhang i wsp., 2003; Kelly i wsp., 2004; Jiang i wsp., 2005; Li i wsp., 2006). Po przeszczepieniu NSC migrowały do miejsc uszkodzenia, różnicując się w neurony i komórki glejowe. Hicks i wsp. (2007) opisali, że wzbogacone środowisko, w którym przebywają gryzonie powoduje wzrost migracji przeszczepionych po ischemii NSC i szybką poprawę stanu ogólnego zwierząt. Neuralne komórki macierzyste izolowane od dorosłych osobników mogą być genetycznie modyfikowane stając się po transplantacji nośnikami genów, które stymulują endogenne procesy regeneracji (Kameda i wsp., 2007). Modyfikacje genetyczne NSC mogą ukierunkować różnicowanie NSC w określone fenotypy neuronalne. Transfekcja progenitorów neuralnych izolowanych ze strefy SVZ dorosłych zwierząt, Nurr-1 powodowała zwiększone przeżycie komórek *in vivo* i ich różnicowanie w dojrzałe neurony dopaminergiczne po przeszczepieniu do prądkowia szczurów w eksperymentalnym modelu choroby Parkinsona (Shim i wsp., 2007).

W eksperymentalnych modelach ischemii u zwierząt oprócz NSC stosowano także ustalone linie progenitorów neuralnych. Linie te zawierają transformowane komórki bądź z racji swojego pochodzenia jak hNT, linia komórek wyprowadzona z teratocarcinoma, która wykazuje cechy ukierunkowanych neuralnie ESC (Andrews i wsp., 1984; Newman i wsp., 2005) lub w wyniku wprowadzenia do NSC onkogenów np. c-myc (Mi i wsp., 2005; Stroemer i wsp., 2008). Powyższe procedury zapewniają nieograniczony wzrost tych komórek *in vitro*, natomiast stwarzają zagrożenie transformacji nowotworowej po przeszczepieniu. Neuralne komórki macierzyste ustalonych linii były stosowane w próbach klinicznych I fazy u pacjentów po udarze. Przeszczepienie komórek hNT do mózgu chorych nie spowodowało powstania nowotworów podczas 2 lat obserwacji klinicznej (Kondziolka i wsp., 2005). Próba kliniczna przeprowadzona w Glasgow z zastosowaniem komórek ReN001 (NSC, pochodzących ze śródmózgowia płodów ludzkich po transfekcji c-myc, gdzie onkogen jest aktywny tylko w obecności Tamoxifenu) u 12 chorych, 6-24 miesięcy po udarze, trwa nadal (NCT01151124). Wśród istniejących linii NSC opisano kilka, które wspomagają powrót utraconych w wyniku uszkodzenia mózgu funkcji ruchowych u zwierząt (Borlongan i wsp., 1998; Jeong i wsp., 2003; Chu i wsp., 2004; Stroemer i wsp., 2008).

Terapia z zastosowaniem egzogennych komórek macierzystych może dotyczyć ich bezpośredniego udziału w repopulacji uszkodzonych struktur (zastępowanie uszkodzonych komórek nerwowych) lub oddziaływania pośredniego poprzez zapewnienie optymalnego mikrośrodowiska do proliferacji, migracji i różnicowania endogennych progenitorów, a także

ochronnego działania w stosunku do dojrzałych neuronów (uwalnianie czynników wzrostu, neuromorfenów i czynników anty-apoptotycznych).



Ryc. 5. Schemat potencjalnego działania egzogennych komórek macierzystych stosowanych w terapii uszkodzeń mózgu (Lindvall, 2010)

W badaniach eksperymentalnych z zastosowaniem komórek przeszczepianych u zwierząt po ischemii, w większości wykorzystywane są komórki nie neuralne pochodzące z różnych źródeł takich jak: szpik kostny, krew pępowinowa, krew obwodowa, tkanka tłuszczowa, tkanki płodu (Leeb i wsp., 2010). Tkanki te zawierają różne populacje komórek multipotencjalnych w tym progenitory hematopoetyczne, endotelialne, mezenchymalne, ale także komórki wykazujące właściwości pluripotencjalne. Somatyczne komórki macierzyste izolowane z tych tkanek wstrzyknięte zwierzętom po udarze, niezależnie od drogi (bezpośrednio do mózgu lub systemowo) i czasu podania (24 godz., 7 dni, 1 miesiąc od momentu niedotlenienia) wykazują korzystny efekt działania, co potwierdziły wyniki testów behawioralnych (Shen i wsp., 2007; Bliss i wsp., 2007; Guzman i wsp., 2008; Hicks i wsp., 2009; Gornicka-Pawlak i wsp., 2011). Mechanizm pozytywnego efektu działania przeszczepionych komórek nie jest jasny. Nie wiadomo czy z przeszczepionych progenitorów izolowanych z tkanek nie neuralnych powstają funkcjonalne neurony czy też poprawa ogólnego stanu zdrowia zwierząt po udarze jest wynikiem biologicznych właściwości tych komórek i ich działań pośrednich takich jak: stymulacja endogennej neurogenезy, neuroprotekcja nowopowstałych neuronów, sterowanie ukierunkowanym różnicowaniem endogennych macierzystych komórek neuralnych, immunomodulacja, działanie przeciwzapalne. Komórki macierzyste izolowane od dorosłych osobników nie budzą kontrowersji etycznych, są łatwo dostępne, w przypadku wielu źródeł stwarzają możliwość przeszczepów autologicznych, niewymagających stosowania immunosupresji, ale podane *in vivo* wykazują krótki czas przeżycia w tkankach biorcy. Mechanizm odpowiedzialny za eliminację egzogennych komórek w mózgu nie został dokładnie poznany, wydaje się, że niekorzystne mikrośrodowisko OUN, brak odpowiednich czynników troficznych i stymulacja efektorów wrodzonej odpowiedzi immunologicznej stanowią przyczyny tych negatywnych zjawisk. Co ciekawe, pomimo iż brak jest żywych komórek dawcy w mózgu zwierząt po udarze, funkcjonalna poprawa i zmniejszenie deficytów neuralnych widoczna jest przez 12 miesięcy po przeszczepie (Shen i wsp., 2007).

Ostatnio, coraz większym zainteresowaniem jako źródło somatycznych komórek macierzystych cieszy się krew pępowinowa, będąca tkanką na pograniczu rozwoju okresu płodowego i dorosłego. Komórki izolowane z krwi pępowinowej są w porównaniu z komórkami szpiku czy krwi obwodowej mniej dojrzałe, mniej immunogenne, wykazują wyższy potencjał proliferacji, dłuższy czas przeżycia w warunkach *in vitro*, są łatwiej dostępne i nie stwarzają niebezpieczeństwa transmisji patogenów po przeszczepieniu biorcom (Kögler i wsp., 2004; Lindvall i wsp., 2004; Habich i wsp., 2011).

Komórki krwi pępowinowej zostały po raz pierwszy przeszczepione w 1998r. w celu odtworzenia elementów morfotycznych krwi u chorego w przypadku anemii Franconi (Gluckman i wsp., 1989). Od tego czasu transplantacja komórek krwi pępowinowej jest z powodzeniem stosowana w chorobach hematologicznych. Początkowo uważano, że krew pępowinowa może stanowić źródło komórek tylko u dzieci, z uwagi na ograniczoną liczbę komórek w jednostce krwi. Obecnie stosuje się przeszczepy krwi pępowinowej od niespokrewnionych dawców u dorosłych chorych onkologicznych (Zhong i wsp., 2010). Wiadomo, iż komórki krwi pępowinowej przeszczepione w przypadku innych schorzeń, w tym OUN zwiększają regenerację tkanek. Wydaje się, iż jest to efekt zróżnicowanej pod względem typów komórek populacji. Heterogenna populacja macierzystych komórek krwi pępowinowej zawiera oprócz komórek hematopoetycznych, progenitory komórek mezenchymalnych, dwie populacje komórek macierzystych wykazujących właściwości pluripotencjalne (USSC, *unrestricted somatic stem cells* i UCSC, *umbilical cord stem cells*) oraz bardzo małe komórki podobne do embrionalnych komórek macierzystych (VSEL, *very small embryonic-like stem cells*).

Modele eksperymentalne, w których przeprowadzono najwięcej badań z użyciem komórek krwi pępowinowej to ischemia okołoporodowa powodująca uszkodzenie mózgu (PIBI, *perinatal ischemic brain injury*) wywoływana u 7-14 dniowych gryzoni i niedotlenienie mózgu u dorosłych zwierząt w wyniku zamknięcia tętnicy szyjnej środkowej mózgu (MCAO, *middle cerebral artery occlusion*). Komórki ludzkiej krwi pępowinowej (hUCBC, *human umbilical cord blood cells*), podawane dożylnie (MCAO) lub dootrzewnowo (PIBI) 48 godz. po ischemii, przywracały utracone funkcje neurologiczne i ruchowe, spowodowane uszkodzeniem mózgu (Chen i wsp., 2001; Willing i wsp., 2003; Vendrame i wsp., 2004; Liu i wsp., 2006; Meier i wsp., 2006; Pimentel-Coelho i wsp., 2010; Yasuhara i wsp., 2010; Xia i wsp., 2010). Interesujące jest to, że pozytywny efekt działania hUCBC był widoczny bez względu na frakcje przeszczepianych komórek takich jak komórki jednojądrzaste, progenitory hematopoetyczne CD34<sup>+</sup> czy mezenchymalne komórki macierzyste. W dostępnej literaturze opisywane są również eksperymenty, w których nie obserwowano pozytywnych efektów terapeutycznych transplantacji hUCBC u zwierząt po ischemii (Makinen i wsp., 2006; Zawadzka i wsp., 2009). Podobnie, oprócz różnic w zachowaniu zwierząt, niektóre badania eksperymentalne wykazały ograniczenie obszaru lezji po przeszczepieniu hUCBC (Borlongan i wsp., 2004; Xiao i wsp., 2005), podczas gdy w innych doświadczeniach nie obserwowano zmian w obszarze uszkodzenia (Liu i wsp., 2006; Meier i wsp., 2006).

Plastyczność komórek kwestionowana przez wiele lat została niedawno w pełni zaakceptowana w oparciu o najnowsze wyniki badań i doceniona przyznaniem w ubiegłym roku nagrody Nobla dla profesora Shinya Yamanaki. Oprócz istniejącego od dawna modelu deterministycznego zakładającego, iż proces różnicowania komórek zdeterminowany programem genetycznym przebiega tylko w określonym kierunku, pojawił się model stochastyczny, gdzie pod silną presją czynników epigenetycznych możliwe jest przejście komórki z wyższego na niższy etap rozwoju. W organizmie taka możliwość jest ograniczona przez działanie środowiska, które wymusza określony przebieg zdarzeń, ale w sytuacjach „awaryjnych” np. podczas regeneracji tkanek oddziaływania środowiska mogą powodować konwersję jednych komórek w inne np. astrocytów w neurony. Wpisując się w teorię

plastyczności komórek udało się w roku 2007 dwóm uczonym japońskim Takahashi i Yamanaka zmienić los dojrzałych komórek myszy, a później także i ludzkich, w komórki macierzyste o właściwościach pluripotencjalnych (Takahashi i wsp., 2006; Takahashi i wsp., 2007). Istotą tej metody była indukcja genów pluripotencjalności typowych dla ESC w komórkach somatycznych poprzez transfer kombinacji genów Oct4, Klf4, c-Myc i Sox2 lub stymulację odpowiednich białek sygnałowych. Powstałe indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPSC, *induced pluripotent stem cells*) wykazują podstawowe cechy embrionalnych komórek macierzystych, czyli nieograniczoną zdolność proliferacji i możliwość wielokierunkowego różnicowania, jednak podobnie jak ESC, niosą ze sobą zagrożenie tworzenia nowotworów (Gore i wsp., 2011; Laurent i wsp., 2011). iPSC mogą być przydatne w terapii wielu chorób, szczególnie tych o podłożu genetycznym (Dimos i wsp., 2008). Badania eksperymentalne z zastosowaniem iPSC w leczeniu uszkodzeń mózgu czy urazu rdzenia kręgowego nie przyniosły oczekiwanych rezultatów, u szczurów stwierdzono powstanie nowotworów (Tsuji i wsp., 2010; Kawai i wsp., 2010).

Pomimo wielu ograniczeń większość badań z zastosowaniem komórek macierzystych przeszczepianych w eksperymentalnych modelach ischemii mózgu wykazała pozytywne działanie tych komórek, obserwowane jako poprawa upośledzonych wcześniej funkcji ruchowych i poznawczych. Te wyniki badań stały się implikacją do rozpoczęcia prób klinicznych z zastosowaniem somatycznych komórek macierzystych w terapii udaru mózgu u ludzi.

#### 1.5.2. Próby kliniczne przeszczepiania komórek u pacjentów po uszkodzeniu mózgu

Próby kliniczne z wykorzystaniem przeszczepów komórek u chorych po udarze są nieliczne. Dotychczas zarejestrowano kilkanaście takich prób, z czego większość badań jest w toku, a ich wyniki jak dotąd nieznane.

W badaniach klinicznych stosowane były populacje komórek różnych typów w tym komórki jednojądrzaste (Friedrich i wsp., 2012; Moniche i wsp., 2012; NCT00859014, Texas; NCT00473057, Rio de Janeiro), progenitory hematopoetyczne (NCT00761982, Asturia; NCT005350197, Londyn), komórki mezenchymalne izolowane ze szpiku kostnego (Bang i wsp., 2005; NCT00875654, Grenoble; NCT01297413, San Diego; NCT01287936, Kalifornia), komórki macierzyste krwi pępowinowej (Man i wsp., 2006), transformowane linie progenitorów neuralnych (Kondziolka i wsp., 2000; Kondziolka i wsp., 2005; NCT01151124, Glasgow), komórki nabłonka węchowego (NCT01327768, Tajwan), komórki śródmózgowia izolowane z ludzkich płodów (Yang i wsp., 2005; Rabinovich i wsp., 2005), przeszczepione w układzie auto- lub alogenicznym, dożylnie, dotętniczo lub do mózgu. Preparaty immunosupresyjne (Methylprednizolon+CsA) zostały zastosowane tylko w przypadku transplantacji komórek NT2 (Kondziolka i wsp., 2000; Kondziolka i wsp., 2005). Jak dotąd podjęto tylko jedną próbę kliniczną transplantacji ksenogenicznych komórek izolowanych ze śródmózgowia płodów świni (Savitz i wsp., 2005). Badania te zostały wstrzymane przez FDA we wczesnej fazie realizacji z uwagi na objawy uboczne u chorych.

Dwie próby kliniczne z wykorzystaniem komórek NT2 zostały przeprowadzone w grupach chorych po udarze jąder podstawnych mózgu, 6 miesięcy – 6 lat po wystąpieniu objawów ischemii. Do badań I fazy zakwalifikowano 12 pacjentów, którzy otrzymali przeszczep NT2 do mózgu w miejsce uszkodzenia tkanki. Zabieg transplantacji okazał się bezpieczny, nie stwierdzono objawów ubocznych. Badania PET wykonane 6 mies. po przeszczepieniu komórek wykazały wysoką aktywność metaboliczną mierzoną ilością wychwytu fluorodeoksyglukozy w

miejscu podania NT2, co świadczy o przeżyciu tych komórek. Przeszczepione NT2 były widoczne w mózgu jednego z pacjentów podczas autopsji 27 mies. po zabiegu transplantacji. W badaniach neurologicznych w czasie 5-letniego okresu obserwacji nie stwierdzono poprawy stanu chorych (Kondziolka i wsp., 2000). W II fazie randomizowanych badań klinicznych brało udział 18 chorych wykazujących stałe deficyty neurologiczne 1-6 lat po udarze, którym przeszczepiono do mózgu  $5-10 \times 10^6$  NT2. Podczas 3,5 lat obserwacji jedynie u 6 z 14 pacjentów stwierdzono nieznaczną poprawę upośledzonych wcześniej funkcji ruchowych. Zmiany te nie były jednak istotne statystycznie w porównaniu z grupą chorych, którym nie podano komórek (Kondziolka i wsp., 2005; Bliss i wsp., 2007; Sahota i wsp., 2011).

Pierwsze próby kliniczne I/II fazy z udziałem 30 i 5 chorych, którym dożylnie w krótkim czasie (< 7 dni) po udarze, przeszczepiono  $1 \times 10^8$  autologicznych komórek mezenchymalnych szpiku kostnego (BM-MSC) nie przyniosły oczekiwanych rezultatów poprawy stanu neurologicznego (Bang i wsp., 2005). Wprawdzie autorzy opisali zmniejszenie deficytów neurologicznych u niektórych chorych, jednak wyniki te zostały zakwestionowane z uwagi na zbyt małą liczbę pacjentów i sposób oceny przeprowadzony niezgodnie z obowiązującymi standardami CONSORT. Pionierskie badania Bang'a wykazały, że przeszczepienie BM-MSC jest bezpieczne, bez ryzyka wystąpienia objawów ubocznych, co potwierdzono w badaniach serologicznych i MRI. Podobne wyniki uzyskano w przeprowadzonej w tym samym czasie w Seulu próby klinicznej z zastosowaniem autologicznych BM-MSC. Wśród zakwalifikowanych do badań 52 osób, 16 chorym przeszczepiono mezenchymalne komórki szpiku. Podczas 5-letniego okresu nie zaobserwowano różnic pomiędzy grupą eksperymentalną i grupą kontrolną (Lee i wsp., 2010). Kolejne 3 próby kliniczne z zastosowaniem auto- lub allogenicznych BM-MSC, podjęte we Francji i USA są w toku.

Przedmiotem badań prób klinicznych I/II fazy przeprowadzonych w Brazylii były autologiczne, jednojądrzaste komórki szpiku kostnego (BM-MNC) ( $2 \times 10^8$ ) przeszczepione dotętniczo 20 pacjentom, 3-7 dni po udarze. Podczas 3 mies. obserwacji u 6 z 20 chorych zanotowano wyraźną poprawę stanu klinicznego. Testy laboratoryjne, EEG, MRI nie wykazały objawów ubocznych po przeszczepie komórek (Friedrich i wsp., 2012). Podobne badania wykonane w Seville nie potwierdziły pozytywnego działania BM-MNC po ich przeszczepieniu w grupie pacjentów po udarze, u 2 z 10 chorych obserwowano zaostrenie objawów choroby 3 mies. po wykonanym zabiegu transplantacji komórek (Moniche i wsp., 2012).

Komórki izolowane ze śródmózgowia płodów ludzkich przeszczepiono w dwóch próbach klinicznych u 10 pacjentów, 4-24 mies. po udarze (I grupa chorych) i 26 pacjentów 3 mies - 30 lat po udarze (II grupa chorych). Komórki wstrzykiwano do przestrzeni podpajęczynówkowej, stan ogólny chorych oceniano w badaniach klinicznych, EEG, CT, MRI. Zabieg przeszczepiania komórek neuralnych okazał się możliwy i bezpieczny. Obserwowano nieznaczną poprawę upośledzonych funkcji motorycznych i funkcji mowy. Z uwagi na brak grupy kontrolnej oraz fakt, że chorzy byli w czasie obserwacji poddawani intensywnej rehabilitacji fizycznej i logopedycznej, ocena ewentualnego pozytywnego działania przeszczepionych komórek neuralnych jest trudna (Yang i wsp., 2005; Rabinovich i wsp., 2005; Bersano i wsp., 2010).

W dostępnych bazach informacyjnych opisano tylko jedną próbę kliniczną z wykorzystaniem komórek macierzystych krwi pępowinowej (HUCB-SC) u pacjentów po udarze. Komórki krwi pępowinowej podano dożylnie, 6-krotnie ( $6 \times 10^8$ ) 10 chorym, 3 mies - 7 lat po wystąpieniu objawów. Nie stwierdzono objawów ubocznych, z uwagi na krótki czas obserwacji chorych trudno było ocenić efektywność przeszczepionych komórek (Man i wsp., 2006).

Krew pępowinowa (UCB) stanowi przedmiot szerokiego zainteresowania jako źródło komórek przeszczepianych w celach regeneracyjnych u dzieci z uszkodzeniami mózgu. Spośród kilkunastu rozpoczętych prób klinicznych tylko dwie dotyczą transplantacji komórek w ostrej fazie uszkodzenia mózgu podczas asfiksji okołoporodowej (NCT00593242, Duke University; NCT01121328, Ain Shams University, Egipt). Biorcami przeszczepu komórek krwi pępowinowej są dzieci z wyraźnymi objawami uszkodzenia mózgu, zdiagnozowanymi w ciągu 14 dni po porodzie. Zgodnie z protokołem zaakceptowanym przez FDA autologiczne komórki UCB są podawane dożylnie tylko w tym wczesnym okresie 2 tygodni. Pomimo dużej liczby przeprowadzonych w Duke University zabiegów transplantacji brak jest informacji o wynikach badań. Z pojedynczych doniesień wynika, iż tylko niewielki procent dzieci wykazuje poprawę stanu neurologicznego po transplantacji UCB (Caroll i wsp., 2012).

Pozostałe próby kliniczne prowadzone są u dzieci z przewlekłymi uszkodzeniami mózgu. Badania z wykorzystaniem autologicznych UCB są prowadzone w ośrodkach USA (NCT01072370, Duke University, NCT01072370, Georgia Health Science University, NCT01343394 University of Texas). W Chinach są stosowane komórki allogeniczne UCB. Komórki krwi pępowinowej podawane są dożylnie. W badaniach uczestniczą dzieci z mózgowym porażeniem dziecięcym w wieku 1-12 lat. Do oceny skuteczności działania przeszczepionych komórek, oprócz badań klinicznych i MRI, cyklicznie badana jest aktywność cytokin. Podobnie jak w przypadku prób klinicznych u dzieci z ostrymi uszkodzeniami mózgu, brak jest opublikowanych wyników badań.

Dotychczasowe badania kliniczne wykazały, iż przeszczepianie komórek z technicznego punktu widzenia jest możliwe i bezpieczne dla pacjentów po udarze, ale wstępne wyniki eksperymentów medycznych nie pozwalają jednoznacznie określić działania podanych komórek. Pomimo nielicznych obserwacji wpływu transplantacji komórek na poprawę upośledzonych w wyniku niedokrwienia mózgu funkcji u chorych po udarze, dalsze badania u zwierząt z wykorzystaniem dobrze zdefiniowanych modeli eksperymentalnych są konieczne.

## 2. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

---

Terapia regeneracyjna w celu odtworzenia uszkodzonych struktur ośrodkowego układu nerwowego, będących przyczyną wielu chorób neurologicznych jest przedmiotem zainteresowania środowisk medycznych i gremiów naukowych. Możliwość wspomaganie odnowy zniszczonych komórek nerwowych pojawiła się z chwilą odkrycia w mózgu dorosłych ludzi neuralnych komórek macierzystych (Eriksson i wsp., 1998). Wyniki badań ostatnich lat wykazały aktywną neurogenezę w strefach neurogennych dojrzałych osób i zdolność migracji powstałych neuroblastów, co świadczy o możliwości powstawania nowych neuronów u ludzi przez cały okres życia (Sanai i wsp., 2004; Minger i wsp., 2007; Curtis i wsp., 2007; Kam i wsp., 2009; Ekonomou i wsp., 2012; Delavaran i wsp., 2012).

Pomimo istnienia neuralnych komórek macierzystych OUN ma ograniczoną zdolność samoodnowy, szczególnie w stanach patologicznych. Uszkodzenie mózgu spowodowane niedokrwieniem indukuje proliferację endogennych progenitorów neuralnych, jednak większość nowopowstałych komórek obumiera w ciągu pierwszych kilku tygodni po udarze. W efekcie, w procesie neurogenyzy po udarze odtworzonych zostaje około 0.2% zniszczonych neuronów (Lindvall i wsp., 2005). Przeszczep komórek macierzystych jest szansą na wspomaganie procesów naprawczych w rejonie uszkodzenia OUN. Terapia z zastosowaniem egzogennych komórek macierzystych ma na celu odbudowę zniszczonych w wyniku ischemii neuronów. Dodatkowo, uwalniane przez przeszczepione komórki czynniki mogą stymulować procesy endogennej neurogenyzy, działać neuroprotekcynie na znajdujące się w strefie uszkodzenia lub nowopowstałe neurony, modulować reakcję immunologiczną w tkance.

Trudności izolacji neuralnych komórek macierzystych od dorosłych dawców, podobnie jak ograniczenia etyczno-prawne w pozyskiwaniu komórek z zarodków i płodów ludzkich, sprawiły, że zaczęto poszukiwać komórek macierzystych o potencjale neuralnym poza OUN. Bogatym źródłem komórek macierzystych okazała się krew pępowinowa, z uwagi na zawartość progenitorów będących na wcześniejszym etapie rozwoju, bardziej plastycznych i mniej immunogennych w porównaniu z innymi tkankami.

Wprowadzenie egzogennych komórek macierzystych do kliniki w celu leczenia chorych po udarze wymaga badań przedklinicznych przeprowadzonych na zwierzętach laboratoryjnych. Postęp w tej dziedzinie zależy od opracowania modeli eksperymentalnych pozwalających na długotrwałe przeżycie przeszczepionych komórek w celu zbadania mechanizmów odpowiedzialnych za procesy proliferacji i różnicowania oraz odtwarzanie struktur nerwowych w mózgu biorców.

Celem moich badań była ocena działania ludzkich neuralnych komórek macierzystych krwi pępowinowej przeszczepionych szczurom poddanym uszkodzeniu mózgu oraz prześledzenie *in vivo* wzajemnych relacji komórek dawcy i biorcy.

Przedmiotem badań były neuralne komórki macierzyste ustalonej nie-transformowanej linii wyprowadzonej w naszym zakładzie z ludzkiej krwi pępowinowej. Wybrany do badań model cytotoksycznego uszkodzenia mózgu z zastosowaniem ouabainy odpowiada w klinice niewielkim uszkodzeniom struktur głębokich mózgu, które ze względu na swoją lokalizację powodują znaczące i trudno poddające się rehabilitacji deficyty neurologiczne.



Cel pracy doktorskiej był realizowany w oparciu o badania *in vivo* dotyczące:

- oceny przeżycia, proliferacji, różnicowania i migracji neuralnych komórek macierzystych ludzkiej krwi pępowinowej (HUCB-NSC) przeszczepianych do istoty białej mózgu szczura w eksperymentalnym modelu uszkodzenia prążkowiec ouabainą
- charakterystyki parametrów wrodzonej i adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej w mózgu biorców przeszczepu HUCB-NSC po zastosowaniu różnych metod immunosupresji
- oceny procesów endogennej neurogenezy w rejonach SVZ i SGZ mózgu szczura po uszkodzeniu ouabainą i transplatacji HUCB-NSC oraz aktywności metaloproteinaz
- identyfikacji endogennych (pochodzących od biorcy) i egzogennych (pochodzących od dawcy) czynników neurotroficznych/neuroprotekcyjnych obecnych w mózgu szczura po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą i przeszczepieniu HUCB-NSC

### 3. MATERIAŁ

---

#### 3.1. Neuralne komórki macierzyste ludzkiej krwi pępowinowej

---

Przedmiotem badań były neuralne komórki macierzyste ludzkiej krwi pępowinowej (HUCB-NSC) ustalonej linii otrzymanej w naszym laboratorium (Bużańska i wsp. 2006). Komórki te hodowane *in vitro* w obecności morfogenów różnicują się w neurony, astrocyty i oligodendrocyty (Jurga i wsp., 2006).

Materiałem wyjściowym do wyprowadzenia linii neuralnych komórek macierzystych była ludzka krew pępowinowa pobrana bezpośrednio po porodzie za zgodą matki dziecka i komisji etycznej. Pierwszym etapem była selekcja frakcji komórek jednojądrzastych w gradiencie Ficol'u, a następnie immunodeplecja metodą sortowania magnetycznego (Milteney i Biotech), progenitorów hematopoetycznych o fenotypie CD34<sup>+</sup>. Pozostałe po izolacji komórki hodowano w gęstości 10<sup>6</sup> komórek/ml w pożywce IMDM (Gibco) z dodatkiem 10% bydlęcej surowicy płodowej FBS (Gibco) przez 6 tygodni w warunkach standardowych (37°C, wilgotność 95%, 5% CO<sub>2</sub>). Otrzymana populacja komórek była negatywna pod względem ekspresji powierzchniowych markerów progenitorów hematopoetycznych (CD34<sup>-</sup>) i komórek leukocytnych (CD45<sup>-</sup>). Po wstępnej selekcji komórek odpowiadających na nabłonkowy czynnik wzrostu (EGF, *epidermal growth factor*), przeprowadzono kolejną wielostopniową selekcję klonogennych komórek nieprzylegających do podłoża i ich ekspansję w pożywce DMEM (Gibco) z dodatkiem 10% FBS (Gibco) i EGF (Sigma) (Bużańska i wsp., 2006). Po przejściowej hodowli w warunkach bez surowicy w obecności EGF, czynnika wzrostu fibroblastów (FGF-2, *fibroblast growth factor-2*) oraz czynnika hamującego białaczkę (LIF, *leukemia inhibitory factor*) otrzymano populację pływających w toni niezróżnicowanych komórek wykazujących wczesne markery neuralne, zdolnych różnicować się w trzy typy komórek neuralnych: neurony, astrocyty oraz oligodendrocyty.

Wyprowadzona w ten sposób unikalna w świecie, stała, nie-transformowana linia neuralnych komórek macierzystych (HUCB-NSC) utrzymuje stałe tempo wzrostu i klonogenność, wykazuje stabilność fenotypową i prawidłowy kariotyp. Komórki HUCB-NSC przeszczepiane u zwierząt nie tworzą guzów nowotworowych. Brak właściwości tumorogennych HUCB-NSC potwierdzono w długotrwałych obserwacjach po ich transplantacji u myszy z defektem immunologicznym (NOD/SCID, *non-obese diabetic/severely combined immunodeficient mice*). Dostępność ludzkich neuralnych komórek macierzystych w naszym laboratorium pozwoliła na stworzenie powtarzalnych układów doświadczalnych do badań *in vitro* i *in vivo* z wykorzystaniem różnych modeli uszkodzenia OUN.

#### 3.2. Zwierzęta doświadczalne

---

Badania były wykonywane z wykorzystaniem szczurów szczepu Wistar (samców) w wieku 3 miesięcy, o ciężarze ciała 250-280 g, pochodzących z Charles River Sulzfeld, hodowanych w zwierzętarni naszego Instytutu. W czasie trwania doświadczenia zwierzęta przebywały w klatkach hodowlanych w fotoperiodzie 12:12, mając stały dostęp do pożywienia i wody. Wszystkie procedury odbywały się zgodnie z wytycznymi Unii Europejskiej i zostały zatwierdzone przez I (uchwała 677/2006) oraz IV (uchwała 56/2009) Lokalną Komisję Etyczną do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie.

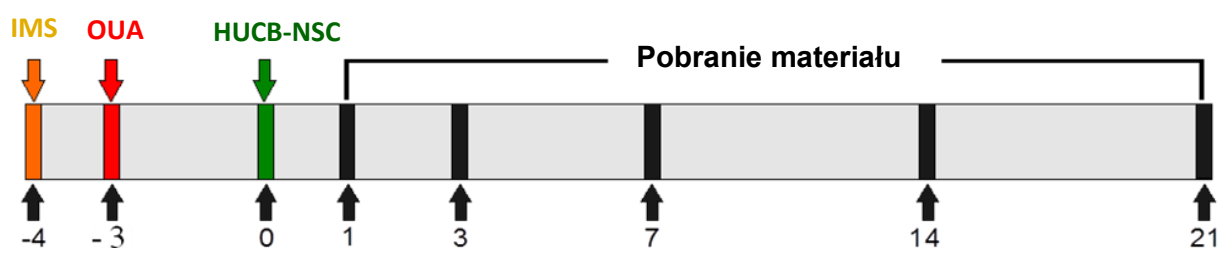
### 3.3. Grupy badawcze

Poszczególne grupy eksperymentalne stanowiły szczury poddane uszkodzeniu mózgu, które otrzymały przeszczep komórek HUCB-NSC:

- Grupa I - bez stosowania immunosupresji
- Grupa II - poddane immunosupresji cyklosporyną A (CsA)
- Grupa III - z zastosowaniem immunosupresji CsA+Depo-Medrol+Azatiopryna
- Grupa IV - z wywołaną tolerancją w okresie neonatalnym

Grupy kontrolne stanowiły:

- Grupa K1 - szczury zdrowe niepoddane uszkodzeniu mózgu ani transplantacji HUCB-NSC
- Grupa K3 – szczury zdrowe z przeszczepem HUCB-NSC



Ryc.6. Schemat przeprowadzonych doświadczeń (IMS – podawanie preparatów immuno-supresyjnych; OUA – wykonanie uszkodzenia mózgu ouabainą; HUCB-NSC – przeszczep komórek)

## 4. METODY BADAŃ

---

### 4.1. Hodowla komórek HUCB-NSC ustalonej linii

---

Komórki HUCB-NSC hodowano w pożywce DMEM/F12 (Gibco) z niską zawartością płodowej surowicy bydła (2% FBS, Gibco), wzbogaconej insuliną, transferyną i selenem (ITS 1:100, Gibco) z dodatkiem antybiotyków (AAS 1:100, Sigma). Hodowlę prowadzono w standardowych warunkach (atmosfera powietrza z zawartością 5% CO<sub>2</sub>, o wilgotności 95% i temperaturze 37°C). W tych warunkach komórki HUCB-NSC rosną w postaci dwóch frakcji: komórek pływających w toni (niezróżnicowanych) i przylegających do podłoża (częściowo zróżnicowanych ukierunkowanych progenitorów neuralnych).

Dwa razy w tygodniu wymieniano połowę objętości pożywki, przesiewając komórki do nowych butelek hodowlanych tak, aby utrzymać stały poziom proliferacji. Pasażowane komórki wysiewano do butelek o pojemności 25 cm<sup>2</sup>, w gęstości 5x10<sup>5</sup> komórek/butelkę. Pożywkę hodowlaną uzupełniano do całkowitej objętości 5 ml.

### 4.2. Znakowanie HUCB-NSC barwnikiem fluorescencyjnym CMFDA

---

Komórki HUCB-NSC przeznaczone do badań *in vivo* były znakowane znacznikiem fluorescencyjnym CMFDA (5-chloromethyl-fluorescein-diacetate) (Molecular Probes) wiążącym się z lipidami błon wewnątrzkomórkowych, co umożliwiło detekcję przeszczepionych komórek we wczesnym (do 3 tygodni) okresie po ich transplantacji podczas analizy immunohistochemicznej skrawków mózgow. Z naszych wstępnych doświadczeń wynika, że znacznik CMFDA utrzymuje się w żywych komórkach do 2-3 tygodni.

Znakowanie komórek odbywało się zgodnie z protokołem opisanym przez producenta. Komórki HUCB-NSC przygotowywane do transplantacji były przenoszone z pożywki hodowlanej DMEM/F12+2%FBS+ITS+AAS do zdefiniowanej pożywki niezawierającej surowicy (NeuroBasal, NB), 24 godz. przed przeszczepem. Tuż przed transplantacją do zawiesiny HUCB-NSC o gęstości 10<sup>6</sup> komórek w 500µl świeżej pożywki NB dodawano 1µl 10 mM znacznika CMFDA. Mieszaninę komórek i znacznika CMFDA inkubowano przez 30 minut w 37°C, następnie wyznakowane komórki HUCB-NSC płukano dwukrotnie w pożywce NB oraz liczone w mikroskopie świetlnym z dodatkiem błękitu trypanu w celu określenia ich żywotności. Bezpośrednio przed zabiegiem transplantacji komórki HUCB-NSC zawieszano w soli fizjologicznej w gęstości 10<sup>7</sup>/ml.

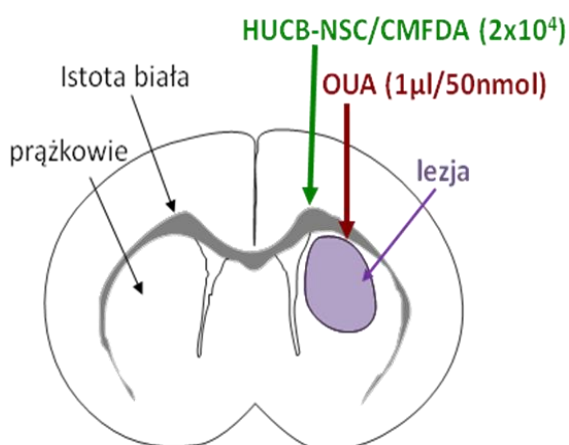
### 4.3. Przygotowanie trójwymiarowych (3D) agregatów HUCB-NSC na nośnikach polimerowych

---

W doświadczeniach użyto wysokousieciowanych trójwymiarowych szkieletów żelatynowych pokrytych lamininą ze średnią wielkością porów 80 -100 mikronów. W celu otrzymania trójwymiarowych (3D) agregatów HUCB-NSC na platformach polimerowych do wyznakowanych wcześniej CMFDA komórek w ilości 10<sup>6</sup> umieszczonych w 1 ml pożywki Neurobasal dodawano szkielety o wymiarach 2x2x2 mm (Protista). Mieszaninę komórek i szkieletów polimerowych wirowano przy prędkości 1000 rpm przez 3 minuty w temperaturze pokojowej. Powstałe 3D agregaty HUCB-NSC na nośnikach polimerowych umieszczano w roztworze PBS, gotowe do przeszczepu.

#### 4.4. Eksperymentalny model uszkodzenia mózgu

Do badań zastosowaliśmy opracowany w naszym zespole model cytotoksycznego uszkodzenia mózgu poprzez podanie inhibitora pompy Na/K – ouabainy (OUA) do prążkowie szczura (Janowski i wsp., 2008). Podczas zabiegu operacyjnego dorosłe szczury samce Wistar zostały poddane znieczuleniu ogólnemu przy użyciu ketaminy (90mg/kg) oraz ksylazyny (10mg/kg) i umieszczone w aparacie stereotaktycznym (Stoelting). U zwierząt będących w narkozie przecinano skórę głowy i nawiercano otwór trepanacyjny o średnicy 0,5 cm na sklepiści czaszki, nad prawą półkulą. Przy użyciu 5  $\mu$ l strzykawki Hamiltona zakończonej igłą o długości 15 mm i średnicy 33, z zastosowaniem pompy infuzyjnej podawano 1  $\mu$ l 50nmol roztworu ouabainy z prędkością 0,5  $\mu$ l/min do prążkowie prawej półkuli szczura (koordynaty: A 0.5, L 3.0, D 5.0 mm; punktami odniesienia w płaszczyźnie horyzontalnej była bregma). Po wstrzyknięciu ouabainy igła pozostawała w mózgu szczura przez kolejnych 5 minut, aby zapobiec wstecznemu wypływowi podanego roztworu. Po wyjęciu igły brzegi rany na skórze zespalało nicią chirurgiczną.



Ryc.7. Schemat struktur mózgu szczura z zaznaczeniem miejsc podania ouabainy oraz miejsca przeszczepu komórek HUCB-NSC

#### 4.5. Metody immunosupresji szczurów-biorców przeszczepu komórek HUCB-NSC

W celu ograniczenia odpowiedzi gospodarza na przeszczep komórek HUCB-NSC zastosowano 2 protokoły immunosupresyjne. Aby zablokować swoistą (adaptacyjną) reakcję immunologiczną biorcy związaną z odpowiedzią limfocytów T podano szczurom cyklosporynę A (CsA) w dawce 10 mg/kg m.c./dobę. Natomiast w celu zahamowania zarówno odpowiedzi swoistej jak i nieswoistej (wrodzonej), charakteryzującej się aktywacją makrofagów, granulocytów obojętnochłonnych i immunoglobulin klasy M zastosowano mieszaninę zawierającą cyklosporynę A (10 mg/kg), DepoMedrol (1.5 mg/kg) i Azatioprinę (5 mg/kg) (Walczak, 2004). Preparaty immunosupresyjne podawano szczurom dootrzewnowo 1 x dziennie przez cały czas trwania eksperymentu, rozpoczynając iniekcje 24 godz. przed przeszczepem komórek HUCB-NSC.

#### 4.6. Pre-immunizacja nowonarodzonych osesków szczurów komórkami HUCB-NSC w celu wywołania tolerancji u dorosłych biorców przeszczepu

---

W celu wywołania u zwierząt tolerancji na przeszczep komórek ludzkich, nowonarodzonym oseskom szczura (P01) podawano dootrzewnowo  $10^5$  komórek HUCB-NSC zawieszonych w objętości 5 $\mu$ l soli fizjologicznej (Kelly i wsp., 2009). Po zabiegu pre-immunizacji zwierzęta przebywały z matką do czasu osiągnięcia przez nie dojrzałości płciowej, następnie po 21 dniach oddzielano młode od matki, ze stada immunizowanych szczurów eliminowano samice, pozostawiając do dalszych eksperymentów tylko samce. Transplantacje komórek HUCB-NSC do mózgu wcześniej immunizowanych biorców przeprowadzano u 6-8 tygodniowych szczurów w momencie, kiedy osiągnęły ciężar ciała 250g.

#### 4.7. Transplantacja komórek HUCB-NSC znakowanych CMFDA do mózgu szczura

---

Dorośle szczury szczepu Wistar, zdrowe, bądź takie, u których 3 dni wcześniej wykonano uszkodzenie prążkowiec ouabainą, zostały poddane znieczuleniu ogólnemu przy użyciu ketaminy (90mg/kg) oraz ksylazyny (10mg/kg) oraz umieszczone w aparacie stereotaktycznym (Stoelting) w celu ich unieruchomienia. Rozpoczynając zabieg chirurgiczny wykonywano przecięcie skóry głowy szczura wzdłuż szwu strzałkowego czaszki, a następnie wywiercano otwór o średnicy 0,5 cm nad prawą półkulą mózgu. Poprzez otwór trepanacyjny wprowadzano igłę o długości 15 mm oraz o średnicy 33 osadzoną na strzykawce Hamiltona o objętości 10  $\mu$ l, podając do istoty białej mózgu szczura (koordynaty: A 0.0, L 4.0, V 3.0 mm; punktami odniesienia w płaszczyźnie horyzontalnej były bregma i lambda) 2  $\mu$ l of HUCB-NSC znakowanych CMFDA ( $2 \times 10^4$ ). Iniekcje komórek HUCB-NSC przeprowadzono przy użyciu pompy infuzyjnej (Stoelting) z prędkością 0.5 $\mu$ l/min. Po przeszczepie komórek HUCB-NSC igła do iniekcji pozostawała w miejscu przez 5 minut, aby zapobiec wstecznemu wypływowi komórek. Po upływie tego czasu igła iniekcyjna została usunięta, cięcie skórne zszyto szwem chirurgicznym, pozostawiając zwierzęta w klatkach przez określony czas obserwacji.

#### 4.8. Transplantacja 3D agregatów komórek HUCB-NSC znakowanych CMFDA umieszczonych na szkieletach żelatynowych, do mózgu szczura

---

Dorośle szczury szczepu Wistar, zdrowe bądź takie, u których 3 dni wcześniej wykonano uszkodzenie prążkowiec ouabainą, zostały poddane znieczuleniu ogólnemu przy użyciu ketaminy (90mg/kg) oraz ksylazyny (10mg/kg) oraz umieszczone w aparacie stereotaktycznym (Stoelting) w celu unieruchomienia. U uśpionych zwierząt przecinano skórę głowy wzdłuż szwu strzałkowego czaszki, a następnie wywiercano otwór o średnicy 0,5 cm nad prawą półkulą mózgu. Poprzez otwór trepanacyjny, po nacięciu opony twardej, za pomocą pincety okulistycznej wprowadzano do kory mózgowej (u zwierząt, które otrzymywały wcześniej OUA ponad miejscem uszkodzenia) 3D agregaty komórek HUCB-NSC usytuowane na szkieletach żelatynowych. Przeciętą skórę zamykano szwem chirurgicznym.

#### 4.9. Badanie proliferacji endogennych progenitorów neuralnych w mózgu szczura

---

Do badania proliferacji endogennych progenitorów neuralnych w mózgu szczura zastosowaliśmy analog tymidyny: 5-bromo-2-deoksyurydynę (BrdU), która w fazie S cyklu komórkowego wbudowuje się do DNA dzielących się komórek. W badaniu eksperymentalnym

doroślým szczurom podawano jednorazowo, dootrzewnowo 50mg/kg BrdU. Dla prześledzenia intensywności wbudowywania znacznika do komórek w regionach neurogennych (SVZ i SGZ) półkuli ipsilateralnej oraz kontralateralnej w różnych sekwencjach czasowych po uszkodzeniu mózgu szczura i transplantacji komórek HUCB-NSC, BrdU podawano 24 godziny przed pobraniem materiału do badań. Obecność komórek BrdU<sup>+</sup> oceniano immunocytochemicznie stosując specyficzne przeciwciała anty-BrdU.

#### 4.10. Pobieranie materiału do badań

W celu pobrania materiału do badań, po zakończeniu eksperymentu szczury były poddawane głębokiej narkozie przy użyciu ketaminy (90mg/kg) oraz ksylazyny (10mg/kg). Zwierzęta przeznaczone do badań endogennej neurogenezy były perfundowane początkowo buforowaną solą fizjologiczną schłodzoną do temperatury 4°C (PBS: 80mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 200mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100mM NaCl), a następnie buforowanym 4% roztworem paraformaldehydu – PFA (Sigma) podawanym bezpośrednio do serca szczura. Do obu płynów dodawano lignokainę oraz heparynę, do uzyskania ostatecznego stężenia 0,01% dla pierwszej substancji i 20 j.m./ml dla drugiej. Płyny perfuzyjne, w objętości ok. 100-200 ml, podawano przy użyciu pompy perfuzyjnej z prędkością zależną od masy ciała przez około 5 minut. Po perfuzji i dekapitacji wyizolowane mózgowia szczurów były dodatkowo utrwalane w 4% roztworze PFA w temperaturze 4°C przez 3 godziny, a następnie poddane krioprotekcji w obecności 20% sacharozy (około 12 godzin w temperaturze 4°C). Tak przygotowane mózgowia były zamrażane w suchym lodzie i przechowywane w temperaturze -70°C do momentu krojenia preparatów. Mózgi zwierząt eksperymentalnych przeznaczone do pozostałych badań zostały wypreparowane bezpośrednio po głębokiej anestezji przy użyciu ketaminy (90mg/kg) oraz ksylazyny (10mg/kg) i dekapitacji z pominięciem utrwalania w PFA oraz krioprotekcji i zamrożone w suchym lodzie. Przed wykonaniem skrawków zamrożone mózgi przenoszono do kriostatu, ogrzewano je do temperatury -20°C i krojono w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości 25 μm, które umieszczano na szkiełkach podstawowych. Po wysuszeniu skrawki analizowano metodami immunohistochemicznymi.

#### 4.11. Analiza immunohistochemiczna

Immunodetekcja komórek miała za zadanie określić stopień proliferacji komórek w mózgu szczura na podstawie obecności markerów typowych dla komórek aktywnych mitotycznie (Ki67, BrdU), populacji komórek neuralnych w oparciu o identyfikację białek (Nestyna, DCX, PSA-NCAM, NF-200, TUJ-1, MAP-2, GFAP, S100β), komórek immunologicznie czynnych (CD5, CD45R, CD15, CD68, IgM) oraz metaloproteinaz. Reakcje immunohistochemiczne przeprowadzono na skrawkach mózgu stosując I-rzędowe przeciwciała specyficzne dla określonych markerów oraz przeciwciała II-rzędowe skoniugowane z fluorochromami (Tabele 1 i 2). Przed inkubacją z pierwszym przeciwciałem, w przypadku białek znajdujących się wewnątrz komórki, przeprowadzono permeabilizację błon komórkowych a następnie blokowanie wiązań nieswoistych (0,2% Triton X-100 z dodatkiem 10% surowicy koziej, temp. 20°C, 60 min). W przypadku białek występujących na powierzchni komórki pominięto etap permeabilizacji błon. Reakcje z przeciwciałami I-rzędowymi przeprowadzono inkubując skrawki mózgu w temperaturze 4°C przez 24 godz. Dla rozwinięcia reakcji barwnych zastosowano odpowiednie II-rzędowe przeciwciała koniugowane ze znacznikami fluorescencyjnymi: anty-mysie IgG1 Alexa Fluor 546; anty-królicze IgG(H+L) Alexa Fluor 546; anty-kozie IgG (H+L) Cy3; anty-mysie IgM Alexa Fluor 546 (Tabela 2). Procedurę barwienia przeprowadzono przez 60 minut w ciemności w temperaturze pokojowej. Dodatkowo, jądra

komórek barwiono 5 $\mu$ M roztworem Hoechst 33258 (Sigma) przez 15 min. Po odplukaniu niezwiązanego barwnika preparaty zamykano przy użyciu odczynnika Fluoromount-G (Southern Biotechnology Association). Jako kontrolę specyficzności użytych przeciwciał zastosowano powyższą procedurę barwienia z pominięciem I-rzędowego przeciwciała.

#### 4.12. Wizualizacja mikroskopowa

Wyniki badań immunohistochemicznych analizowano w mikroskopie konfokalnym Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss) wyposażonym w lasery: helowo-neonowy, (543 nm), który służył do wzbudzenia czerwonego barwnika Alexa Fluor 546, argonowy (488 nm), wykorzystany do wzbudzenia zielonego barwnika przyżyciowego, CMFDA, którym były znakowane komórki HUCB-NSC oraz diodę 405 nm wykorzystywaną do wzbudzenia niebieskiego barwnika Hoechst 33258. Po rejestracji uzyskane obrazy mikroskopowe analizowano w programie ZEN 2008 (Zeiss). W celu obliczenia liczby poszczególnych fenotypów w populacji przeszczepionych HUCB-NSC lub komórek odpowiedzi immunologicznej biorcy analizowano poszczególne pola preparatów skrawków mózgu, zarejestrowane w postaci zdjęć. Do określenia liczby komórek zliczano wartości z 12 zdjęć wykonanych z każdego z 5-8 mózgow w poszczególnych grupach eksperymentalnych (1300-2400 komórek dla każdego z badanych markerów). Analizę liczbową przedstawiono jako procent komórek immunopozytywnych, dane przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  błąd standardowy.

#### 4.13. Oznaczanie aktywności metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 w mózgu szczurów

W celu określenia aktywności metaloproteinaz (żelatynaz) MMP-2 i MMP-9 w mózgu szczurów zastosowano metodę zymografii *in situ* opartą na zdolności tych enzymów do proteolizy żelatyny. W tym celu pobrane od zwierząt doświadczalnych skrawki mózgu były inkubowane w roztworze żelatyny (100 mg/ml) związanej z fluoresceiną (*DQTM gelatin from pig skin, fluorescein conjugate*) (Molecular Probes). Inkubacje prowadzono w wilgotnej komorze pozbawionej dostępu światła, w temperaturze 37<sup>o</sup>C przez 3 godziny. W celu wykluczenia niespecyficznego fluorescencji niektóre skrawki inkubowano w roztworze żelatyny, do którego dodawano niespecyficznego inhibitora metaloproteinaz - fenantrolinę (Sigma). Stężenie końcowe inhibitora w mieszaninie reakcyjnej wynosiło 1mM. Po zakończonej inkubacji skrawki mózgu płukano w roztworze PBS i przeprowadzono barwienia immunohistochemiczne. Natężenie fluorescencji peptydów uwolnionych w wyniku proteolizy żelatyny stanowiło wykładnik aktywności metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9.

#### 4.14. Analiza ekspresji genów

Izolację RNA z mózgu szczurów przeprowadzano stosując zmodyfikowaną metodę Chomczyńskiego i Sacchi (1987). Przy użyciu narzędzia do biopsji pobierany był wycinek tkanki o średnicy 3 mm, zawierający fragment uszkodzonego prążkowiec oraz istoty białej z przeczepionymi komórkami. Całkowite RNA izolowano z homogenatów mózgu stosując TRIZOL Reagent (Sigma) zgodnie z instrukcją producenta. Następnie przy użyciu urządzenia NanoDrop 2000 firmy Amersham Pharmacia Biotech wyznaczono wartości stosunku absorbancji przy 260 nm i 280 nm w celu określenia stężenia oraz czystości preparatów kwasu nukleinowego. Do dalszych badań używano próbki RNA o czystości równej około 2. Do reakcji odwrotnej transkrypcji wykorzystano zestaw odczynników High Capacity RNA-to-cDNA Kit firmy Applied Biosystems w warunkach zalecanych przez producenta.



Reakcję PCR przeprowadzono w 25 µl objętości mieszaniny zawierającej 1U Taq DNA Polymerase, 400 µM dNTPs i równą ilość cDNA dla każdego genu, z dodatkiem 1 µM starterów w orientacji (F, *forward*) i (R, *reverse*) w obecności 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Startery do amplifikacji wybranych genów zaprojektowano przy użyciu programu BLAST lub wykorzystano sekwencje dostępne w literaturze. Zaprojektowane startery wykonano w firmie Sigma-Genosys. Produkty PCR rozdzielono za pomocą elektroforezy na 2% żelu agarozowym w 0,5x stężonym buforze TBE. Wykonano zdjęcia DNA wyznakowanego bromkiem etydyny, po czym dokonano pomiarów densytometrycznych i opracowano cyfrowo w programie GelExpert v. 4.0.

W badaniach stosowano również metodę PCR w czasie rzeczywistym (RealTime PCR) SYBR Green Real Time PCR wykorzystującą znacznik należący do rodziny asymetrycznych cyjaninowych barwników fluorescencyjnych. Barwnik ten łącząc się z dwuniciowym DNA daje silny sygnał wprost proporcjonalny do ilości DNA w próbce. Reakcję Real Time PCR przeprowadzono w 96 dołkowych płytkach w 25 µl objętości mieszaniny zawierającej startery o stężeniu 10 µM w orientacji Forward i Reverse, 1 µg cDNA, 12,5 µl SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) oraz odpowiednią ilość wody. Reakcje prowadzono w aparacie ABI Prism 7500 Sequence Detection System. Jako gen referencyjny stosowano gen metabolizmu podstawowego dehydrogenazy aldehydu-3-fosfoglicerynowego (GAPDH). Wyniki badań przedstawione zostały w postaci wartości  $\Delta CT$ :  $\Delta CT = CT_{\text{gen badany}} - CT_{\text{GAPDH}}$ . Mniejsza wartość  $\Delta CT$  świadczy o wyższej ekspresji badanego genu.

#### 4.15. Analiza statystyczna

---

Otrzymane wyniki przedstawiono jako wartości średnie z szeregu doświadczeń  $\pm$  SEM. Ilość powtórzeń zaznaczono w opisie rycin. W celu testowania statystycznej istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA oraz test Bonferroni. Do wszystkich obliczeń stosowano program Prism 3.0. Poziom istotności mniejszy niż 0.05 przyjęto za statystycznie znamienne.

TABELA 1. Przeciwciała pierwszorzędowe używane w badaniach immunocytochemicznych

PRZECIWCIAŁO GOSPODARZ	IZOTYP ROZCIĘCZENIE	PRODUCENT NUMER KATALOGOWY
Monoklonalne anty-NF200 (mysz)	IgG1 1:400	Sigma Nr kat.: NO142
Monoklonalne anty-β-Tubulina III (TUJ1) (mysz)	IgG2a 1:750	Covance Nr kat.: MMS-435P
Poliklonalne anty-GFAP (królik)	IgG (H+L) 1:200	Cappel Nr kat.: 10555
Monoklonalne anty-Ki67 (mysz)	IgG1 1:100	Novacastra Nr kat.: NCL-L-Ki67-MMI
Monoklonalne anty- ED1 (mysz)	IgG1 1:50	AbD Serotec Nr kat.: MCA 341R
Monoklonalne anty-BrdU (mysz)	IgG1 1:200	Sigma Nr kat.: B 8434
Monoklonalne anty-PSA-NCAM (mysz)	IgM 1:200	Chemicon Nr kat.: MAB 5324
Monoklonalne anty-CD5 (mysz)	IgG1 1:25	AbD Serotec Nr kat.: MCA 52GA
Monoklonalne anty-CD15 (mysz)	IgM 1:50	AbD Serotec Nr kat.: MCA 967
Monoklonalne anty-CD45RA (mysz)	IgG1 1:100	AbD Serotec Nr kat.: MCA 34OR
Poliklonalne anty-DCX (koza)	IgG (H+L) 1:200	Santa Cruz Nr kat.: Sc-8067

TABELA 2. Przeciwciała drugorzędowe wykorzystane w badaniach immunocytochemicznych

PRZECIWCIAŁO GOSPODARZ	FLUOROCHROM	IZOTYP/ ROZCIĘCZENIE	PRODUCENT NR KAT.
Alexa Fluor kozie anty-mysie	Alexa 546	IgG (H+L) 1:100	Molecular Probes Nr kat.: A-11001
Alexa Fluor kozie anty-królicze	Alexa 546	IgG (H+L) 1:500	Molecular Probes Nr kat.: A-11035
Alexa Fluor kozie anty-mysie	Alexa 546	IgG1 1:500	Molecular Probes Nr kat.: A-21123
Alexa Fluor kozie anty-mysie	Alexa 488	IgG1 1:500	Molecular Probes Nr kat.: A-21121
Alexa Fluor kozie anty-mysie	Alexa 546	IgG2a (γ2a) 1:500	Molecular Probes Nr kat.: A-21133
Alexa Fluor kozie anty-mysie	Alexa 546	IgM 1:500	Molecular Probes Nr kat.: A-21045
kozy anty-królicze	Cy3	IgG (H+L) 1:800	Jackson ImmunoRes Nr kat.: 111165045

TABELA 3. Startery specyficzne dla genów ludzkich użyte do analizy ekspresji genów metodą PCR

Nazwa białka/ genu	Wielkość produktu reakcji (pz)	Sekwencja starterów	
		Forward	Reverse
GAPDH	73	CCACATCGCTCAGACACCAT	TGACCAGGCGCCCAATA
GDNF	92	TTTAGGTACTGCAGCGGCTCTT	TCACTCACCAGCCTTCTATTTCTG
BDNF	80	ATTACAATCAGATGGGCCACATG	AGGGAGAAAGCAGAAACAAGACA
HGF	151	GCCCTATTTCTCGTTGTGAAGGT	CTGTATCTCAAACCTAACCATCCATCCTATG
EGF	85	GCAGAGGGATACGCCCTAAGT	CAAGAGTACAGCCATGATTCCAAA
IGF-1	68	TGCTTCCGGAGCTGTGATCTA	GCTGACTTGGCAGGCTTGAG
NT3	73	AACATCACGGCGGAAACGGTAC	ACTCTCACTGTACATAACCGAGTACTCC
CNTF	69	TGTGCGTGCTTGCATGTG	ACCCTGAAGTGAAGGACGTT
Prosapozyna	165	AACAGACCAGGTGTCCTTGG	CCATGTTAAAGGGCTCGTGT
Semaforyna	219	CCCTGGGGAACCTTCTACCTC	TCGAAGTCTTGTTCCCTGCT

TABELA 4. Startery specyficzne dla genów szczurzych użyte do analizy ekspresji genów metodą PCR

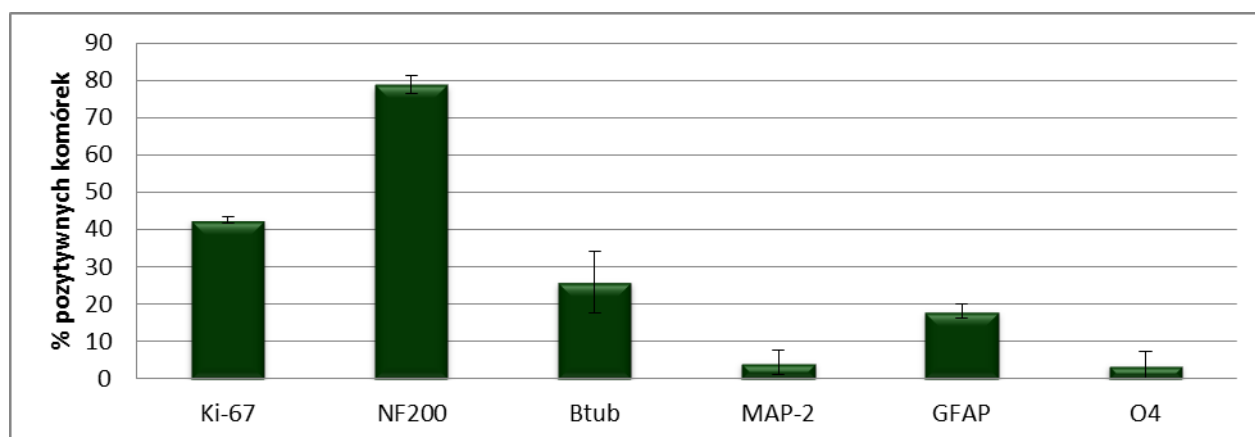
Nazwa białka/genu	Wielkość produktu reakcji (pz)	Sekwencja starterów	
		Forward	Reverse
GAPDH	145	AGGGTGGTGGACCTCATGGC	AGTGCTCAGTGTGGGGGCT
GNDF	144	AAGGTCGCAGAGGCCAGAGG	TCTCGGCCGCTTCACAGGAA
BDNF	136	CGGCTGGTGCAGGAAAGCAA	TCAGGTCACACCTGGGGCTG
HGF	101	CAATTTGGACCATCCTGTAATATCC	TCAAACCTAACCATCCACCCTACTG
EGF	74	TCTGGGCTCAGGACGGTAGA	ATGGATGGAGCCACCGTTATAG
IGF-1	145	CAGCATTCCGGAGGGCACCAC	CATGTCAGTGTGGCGCTGGG
NT3	74	AGAGGCCACCAGGTCAGAATT	TGTAGCGTCTCTGTTGCCGTAGT
CNTF	78	GGTTATTCTGGCTATGCAAATGTG	GATAGGTGGGCCATCCATTTATT
Prosapozyna	222	TAGGTCCATTTAACTGCACA	ACTTCTGAATGTAACCTTGCC
Semaforyna	252	GGGGACTCAAGAACCCCACTCCC	TCCGTGCTCCCAGGTGATCCG

## 5. WYNIKI BADAŃ

### 5.1. Charakterystyka komórek linii HUCB-NSC w hodowli in vitro

Komórki HUCB-NSC hodowane w pożywce z niską zawartością surowicy (DMEM/F12+2%FBS+ITS+AAS) tworzą heterogenną populację komórek pływających w toni bądź przylegających do podłoża. Komórki pozostające w zawieszynie mają kształt okrągły, występują pojedynczo bądź w postaci pływających agregatów. Wśród komórek adherentnych obserwuje się komórki o wydłużonym, wrzecionowatym kształcie z krótkimi wypustkami. W hodowli HUCB-NSC widoczne są komórki proliferujące, których liczba, określona poprzez barwienie immunocytochemiczne na obecność markera komórek aktywnych mitotycznie Ki67, wynosi  $42.6 \pm 3.73\%$ . Analiza markerów neuralnych w całej populacji komórek HUCB-NSC ujawniła ekspresję wczesnego markera neuronów NF-200 ( $78.1 \pm 4.11\%$ ),  $\beta$ Tubuliny III, typowej dla późniejszego stadium różnicowania neuronalnego ( $25.88 \pm 3.28\%$ ) i białka MAP-2, obecnego w dojrzałych neuronach ( $4.29 \pm 1.9\%$ ), a także markerów GFAP ( $18.1 \pm 2.46\%$ ) i O4 ( $3.55 \pm 0.94\%$ ) specyficznych odpowiednio dla astrocytów lub oligodendrocytów (ryc.8).

Taka populacja HUCB-NSC, w postaci połączonych frakcji komórek pływających i przylegających do podłoża była używana do transplantacji eksperymentalnych, będących przedmiotem badań w mojej pracy doktorskiej.

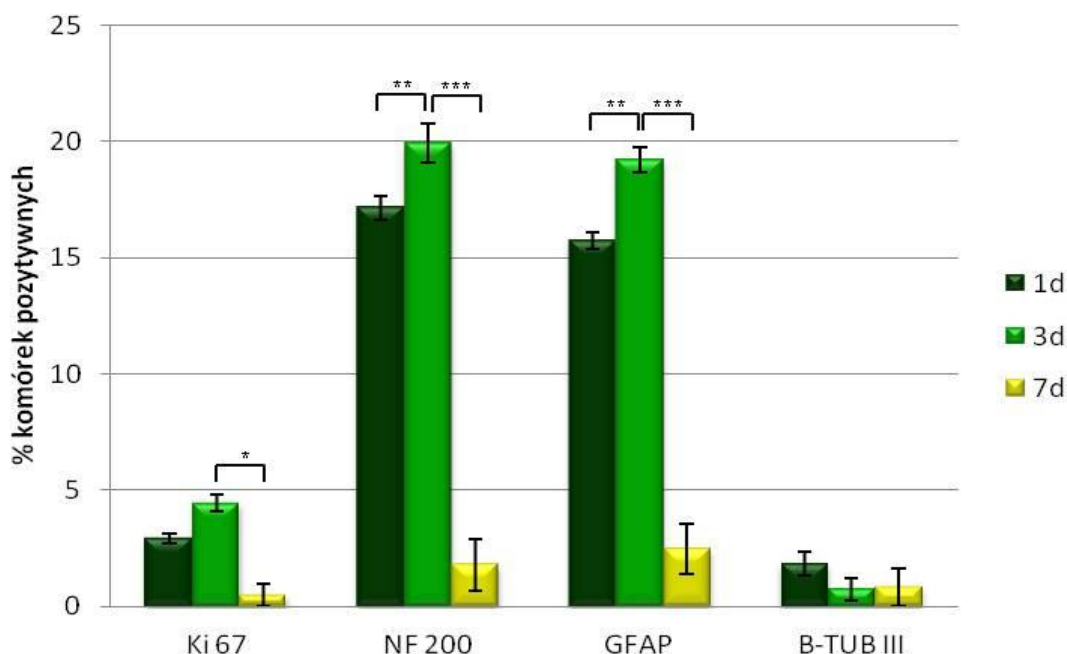


Ryc.8. Wykres przedstawia procentowy udział komórek HUCB-NSC wykazujących obecność wybranych markerów neuralnych w połączonych frakcjach komórek pływających i przylegających do podłoża. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie  $\pm$ SEM, n=5.

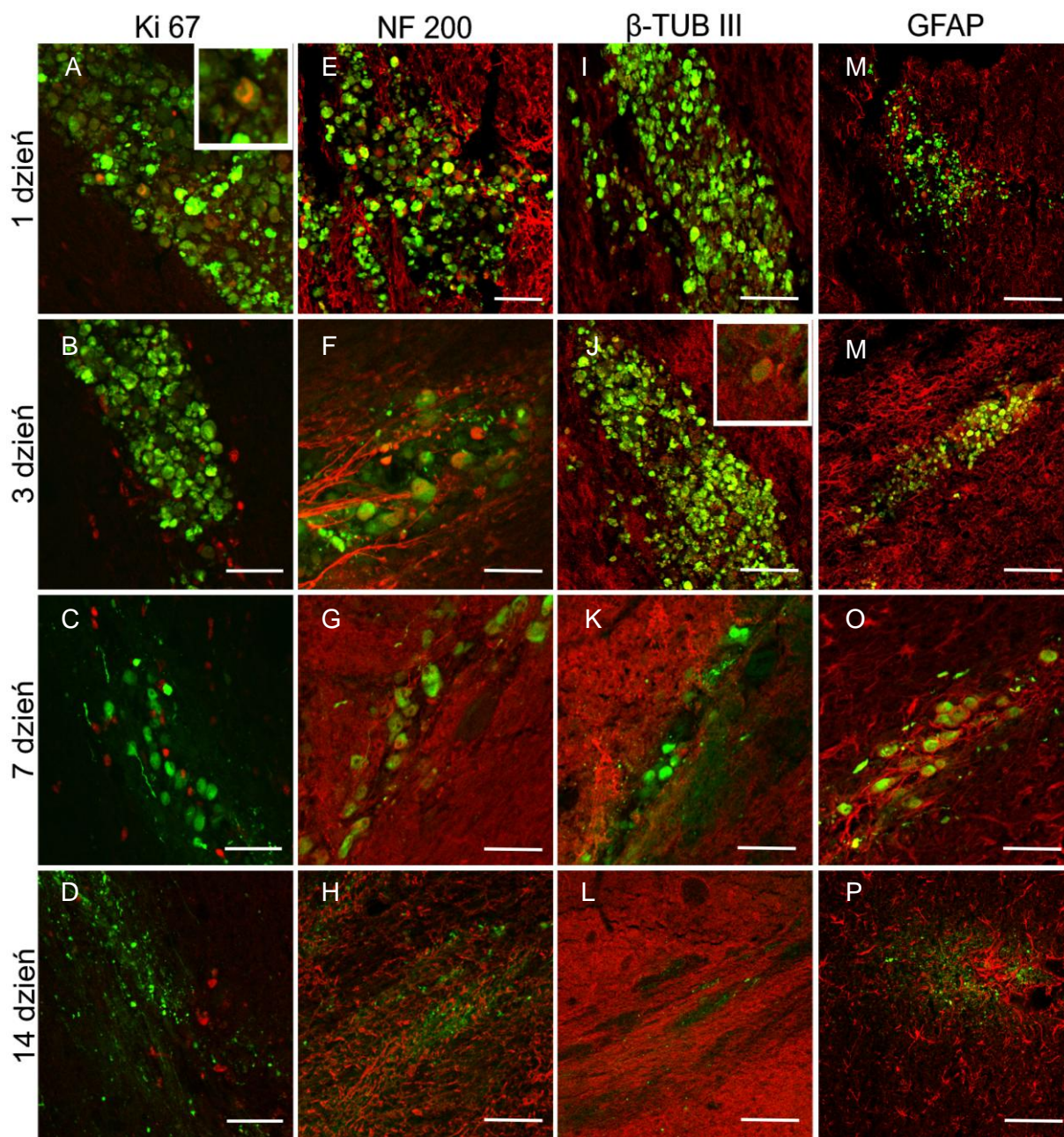
## 5.2. Wyniki badań in vivo po transplantacji HUCB-NSC do mózgu zdrowych szczurów

## 5.2.1. Identyfikacja HUCB-NSC w mózgu zdrowych szczurów – biorców przeszczepu

Komórki HUCB-NSC wyznakowane zielonym barwnikiem fluorescencyjnym CMFDA przeszczepione do istoty białej dorosłych zdrowych szczurów były analizowane w mikroskopie konfokalnym. Obecność poszczególnych fenotypów HUCB-NSC w mózgu szczura po ich przeszczepie oceniano immunohistochemicznie z użyciem specyficznych przeciwciał. Po 24 godzinach od momentu transplantacji większość komórek HUCB-NSC pozostawała w miejscu podania i jedynie nieliczne z nich migrowały w tkance gospodarza. Wśród HUCB-NSC obecnych we wszczepie  $3.68 \pm 0.87\%$  stanowiły komórki zdolne do proliferacji (Ki67-pozytywne),  $17.14 \pm 1.89\%$  komórek wykazywało obecność markera wczesnych neuronów NF-200, a  $15.73 \pm 0.52\%$  komórek, obecność białka GFAP charakterystycznego dla astrocytów. Trzeciego dnia po transplantacji wśród komórek HUCB-NSC zaobserwowano niewielki wzrost liczby komórek zdolnych do proliferacji, wykazujących obecność markera Ki67 ( $2.94 \pm 0.21\%$ ), a także zwiększenie udziału komórek wykazujących obecność markerów neuralnych NF-200 czy GFAP (odpowiednio  $19.92 \pm 0.9\%$  i  $19.2 \pm 1.48\%$ ). Po 7 dniach od transplantacji HUCB-NSC widoczna była migracja przeszczepionych komórek wzdłuż włókien istoty białej mózgu. Komórki te pozostawały żywe, jednak w populacji HUCB-NSC w mózgu szczura obserwowano tylko nieliczne komórki aktywne mitotycznie (Ki-67 pozytywne). Wśród komórek dawcy jedynie  $1.78 \pm 1\%$  HUCB-NSC wykazywało obecność markerów NF-200, a  $2.47 \pm 1.35\%$  HUCB-NSC było pozytywnych pod względem markerów GFAP. Dwa tygodnie po transplantacji, w tkance gospodarza brak było żywych komórek dawcy. W miejscu wszczepu obserwowano jedynie *debris* ludzkich komórek (ryc.9, 10).



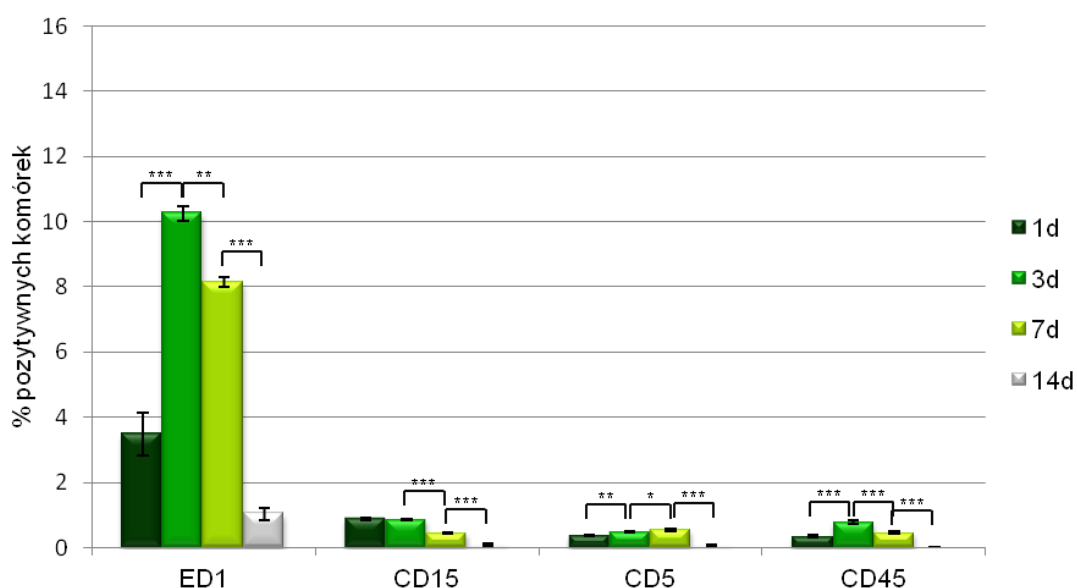
Ryc.9. Wykres przedstawia procentowy udział komórek HUCB-NSC wykazujących obecność wybranych markerów neuralnych po przeszczepie do mózgu zdrowych dorosłych szczurów ocenianych w poszczególnych dniach eksperymentu. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie  $\pm$ SE,  $n=6$ , \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ .



Ryc.10. Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA (kolor zielony) po transplantacji do mózgu szczura. Analiza immunohistochemiczna, po zastosowaniu przeciwciała anti-Ki67 (A, B, C, D), anti-NF-200 (E, F, G, H), anti-TUJ1 (I-L) oraz anti-GFAP (M-P) (kolor czerwony). Obraz widoczny w mikroskopie konfokalnym po 24 godz. (A, E, I, M); 3 dniach (B, F, J, N); 7 dniach (C, G, K, O); 14 dniach (D, H, L, P) od przeszczepu HUCB-NSC do istoty białej dorosłego szczura. Skala 100  $\mu$ m

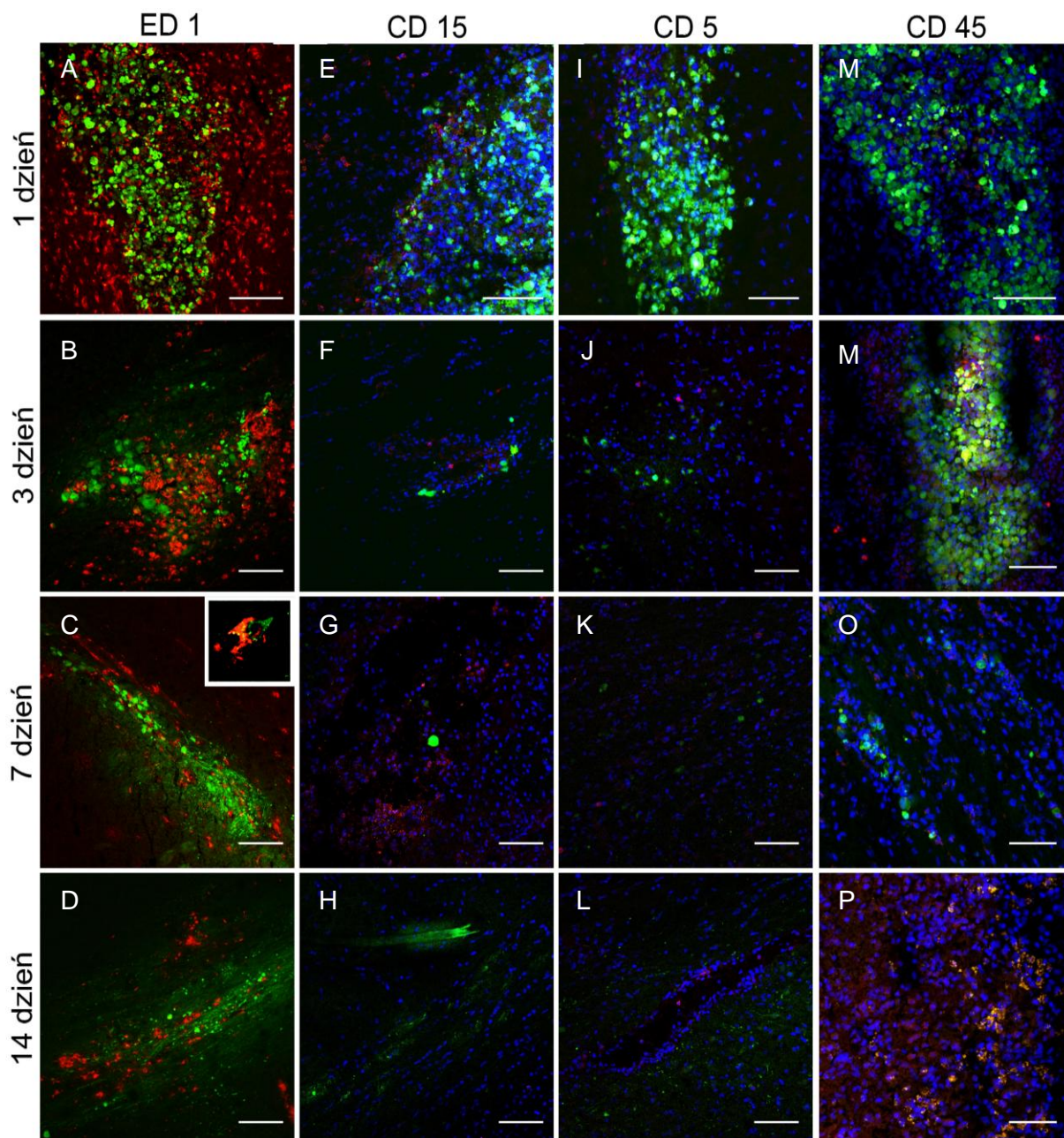
## 5.2.2. Odpowiedź immunologiczna w mózgu szczurów po przeszczepie HUCB-NSC

W pierwszej dobie po przeszczepie HUCB-NSC do mózgu dorosłych szczurów, w okolicach wszczepu obserwowano infiltrację makrofagów/mikrogleju (ED1), neutrofile (CD15) oraz obecność nielicznych limfocytów T (CD5) i B (CD45). Trzeciego dnia po transplantacji HUCB-NSC wzrost liczby komórek ED1<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup> oraz CD45<sup>+</sup> był istotny statystycznie, natomiast nie odnotowano zmian w liczbie komórek CD15-pozytywnych. Po 7 dniach widoczny był istotny statystycznie spadek liczby wszystkich badanych komórek odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Dwa tygodnie po przeszczepie ludzkich neuralnych komórek macierzystych w miejscu tworzenia się blizny glejowej obserwowano pojedyncze makrofagi/mikroglej, neutrofile oraz limfocyty T i B (ryc.11,12).



Ryc.11. Wykres przedstawia procentowy udział komórek immunologicznych gospodarza po przeszczepie HUCB-NSC do mózgu zdrowych dorosłych szczurów w poszczególnych dniach eksperymentu. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie  $\pm$ SE,  $n=6$ , \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ .



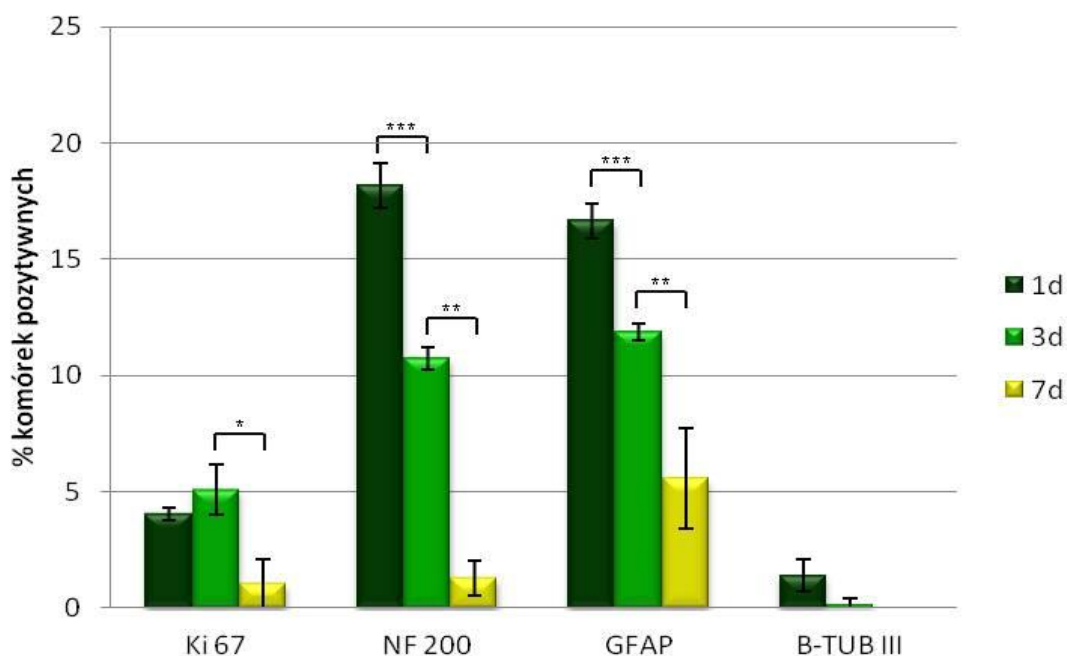


Ryc.12. Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA (kolor zielony) po transplantacji do mózgu szczura. Analiza immunohistochemiczna, po zastosowaniu przeciwciała anti-ED1 (A, B, C, D), anti-CD15 (F, G, H), anti-CD5 (I-L) oraz anti-CD45 (M, N, O, P) (kolor czerwony). Obraz widoczny w mikroskopie konfokalnym: po 24 godz. (A, E, I, M); 3 dniach (B, F, J, N); 7 dniach (C, G, K, O); 14 dniach (D, H, L, P) od przeszczepu HUCB-NSC do istoty białej dorosłego szczura. Jądra komórek wyznakowano dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 100  $\mu$ m

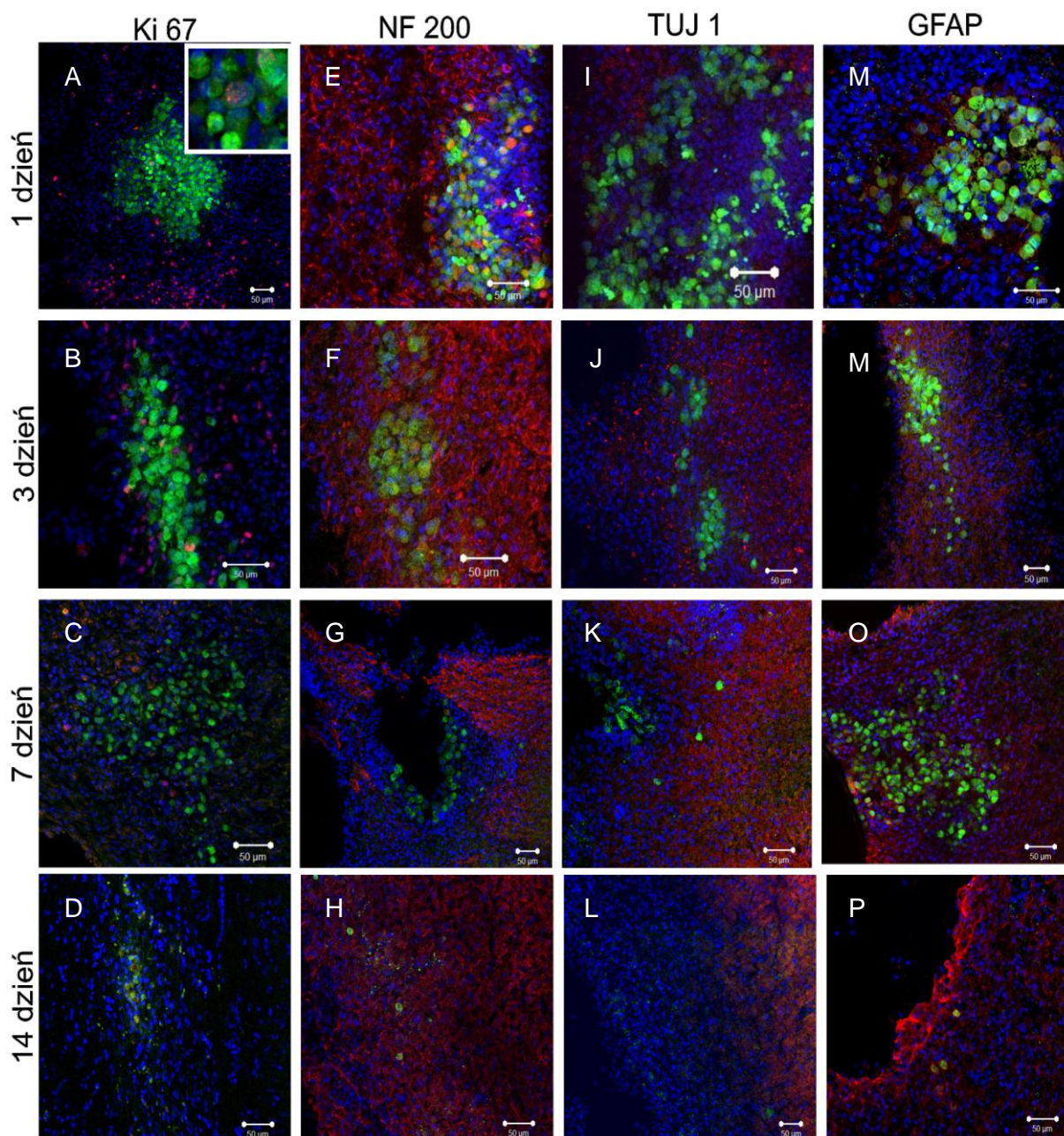
## 5.3. Transplantacja HUCB-NSC do mózgu szczurów po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą

## 5.3.1. Identyfikacja HUCB-NSC przeszczepionych do mózgu szczurów po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą

Pierwszego dnia po transplantacji komórki HUCB-NSC pozostawały w miejscu ich podania. Po 24 godzinach od momentu przeszczepu  $22.82 \pm 0.6\%$  z nich wykazywało antygeny charakterystyczne dla wczesnych neuronów (NF-200), a  $22.84 \pm 1\%$  antygeny astrocytów (GFAP). Trzy dni po przeszczepieniu u  $5.1 \pm 1.1\%$  komórek pozostających we wszczepie, stwierdzono obecność markera proliferacji Ki67. W tym czasie obserwowano pojedyncze komórki HUCB-NSC migrujące w kierunku uszkodzenia. Większość komórek dawcy pozostających w mózgu szczura była w stanie niezmienionym, niewielka część populacji HUCB-NSC wykazywała obecność wczesnych antygenów neuralnych (NF-200 –  $10.73 \pm 1.5\%$ ; GFAP –  $11.86 \pm 0.58\%$ ). Spadek liczby komórek będących już na ścieżce różnicowania pomiędzy dniem pierwszym a trzecim eksperymentu był istotny statystycznie. Siedem dni po transplantacji obserwowano wyraźną migrację HUCB-NSC wzdłuż włókien istoty białej. Komórki dawcy gromadziły się w bliskim sąsiedztwie uszkodzenia. Wśród nich, widoczne były pojedyncze komórki o fenotypie młodych neuronów NF-200+ ( $1.28 \pm 0.75\%$ ) i astrocytów ( $5.55 \pm 2.15\%$ ) i komórki aktywne mitotycznie Ki67+ ( $1.04 \pm 1.04\%$ ). Po 14 dniach od momentu transplantacji HUCB-NSC nie stwierdzono obecności żywych komórek dawcy. W miejscu wszczepu i w okolicy uszkodzenia tkanki widoczne było jedynie *debris* komórek ludzkich (ryc.13,14).



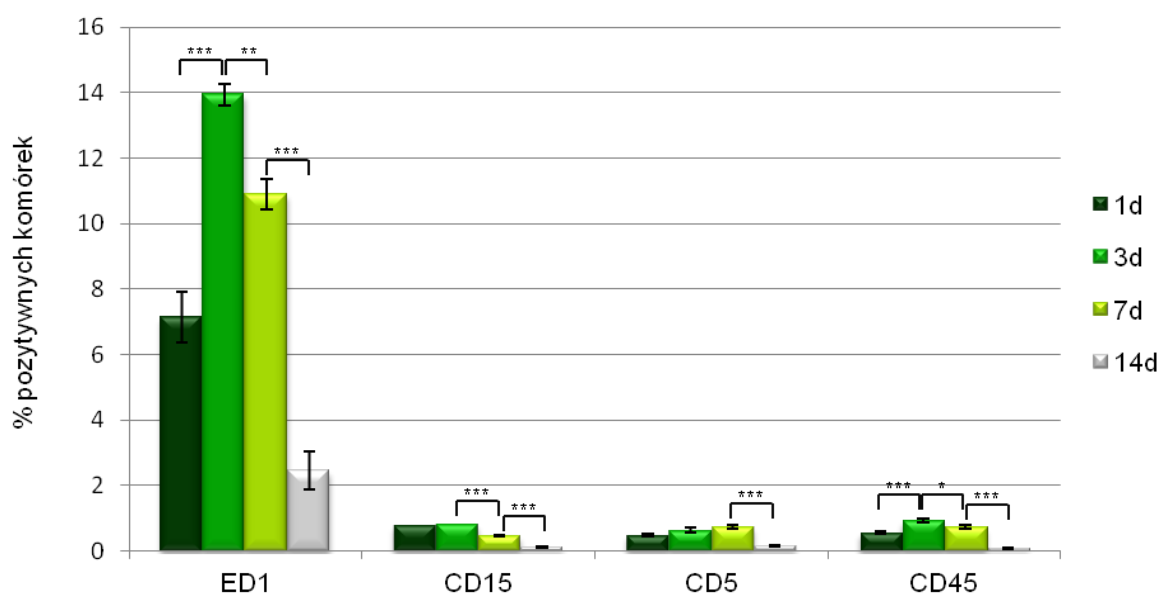
Ryc.13. Wykres przedstawia procentowy udział komórek HUCB-NSC wykazujących obecność wybranych markerów neuralnych po przeszczepie ich do mózgu dorosłych szczurów z wywołanym podaniem ouabainy uszkodzeniem prążkowiec w poszczególnych dniach eksperymentu. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie  $\pm$ SE.  $n=5$ , \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ .



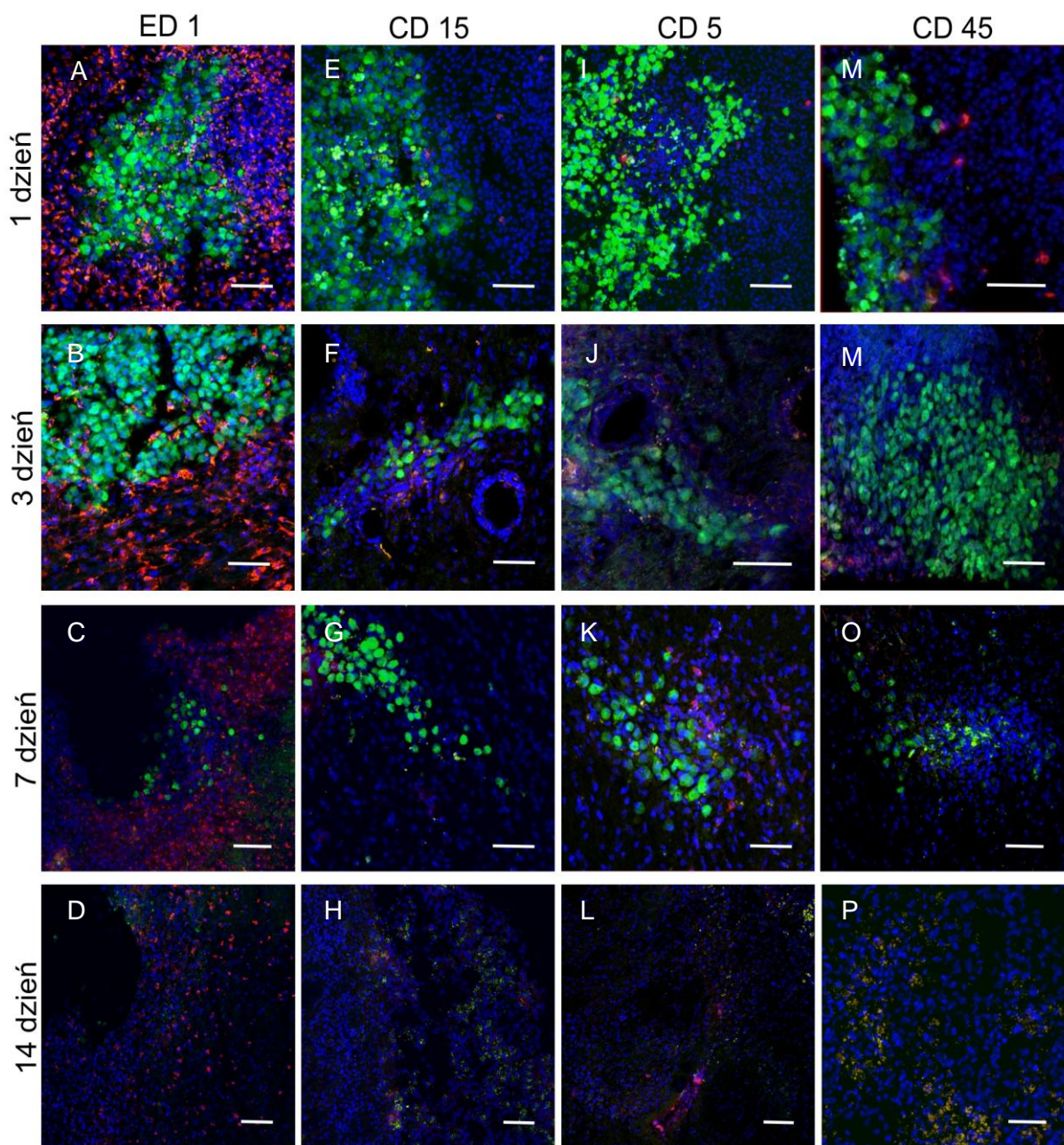
Ryc.14. Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA (kolor zielony) po transplantacji do mózgu szczura z wywołanym podaniem ouabainy uszkodzeniem prążkowiec. Analiza immunohistochemiczna, po zastosowaniu przeciwciała anti-Ki67 (A, B, C, D), anti-NF200 (F, G, H), anti-TUJ1 (I, J, K, L) oraz anti-GFAP (M, N, O, P) (kolor czerwony). Obraz w mikroskopie konfokalnym po 24 godz (A, E, I, M); 3 dniach (B, F, J, N); 7 dniach (C, G, K, O); 14 dniach (D, H, L, P) od przeszczepu HUCB-NSC do istoty białej dorosłego szczura. Jądra komórek, wyznakowano dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 50  $\mu\text{m}$

### 5.3.2. Odpowiedź immunologiczna w mózgu szczura po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą i po przeszczepie komórek HUCB-NSC

W badaniach immunohistochemicznych wykazano, że po 24 godz. od transplantacji HUCB-NSC w okolicy wszczepu oraz uszkodzenia, pojawiają się komórki gospodarza: ED1<sup>+</sup> oraz CD15<sup>+</sup>, jak również pojedyncze komórki CD5<sup>+</sup> i CD45<sup>+</sup>. W 3 dniu po przeszczepie HUCB-NSC liczba komórek ED1<sup>+</sup> i CD 45<sup>+</sup> wzrasta i jest to wzrost istotny statystycznie, natomiast udział komórek CD5<sup>+</sup> oraz CD15<sup>+</sup> pozostaje na tym samym poziomie. Po 7 dniach liczba komórek ED1<sup>+</sup>, CD15<sup>+</sup> oraz CD45<sup>+</sup> obniża się w porównaniu z dniem trzecim i zmiana ta jest istotna statystycznie. Po 2 tygodniach od transplantacji nieliczne komórki ED1<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD15<sup>+</sup> oraz CD45<sup>+</sup> są widoczne w miejscu tworzenia się blizny glejowej, w mózgu szczura obserwuje się jedynie pojedyncze HUCB-NSC (ryc.15,16).



Ryc.15. Wykres przedstawia procentowy udział komórek immunologicznych gospodarza po przeszczepie HUCB-NSC do mózgu dorosłych szczurów z wywołanym podaniem ouabainy uszkodzeniem prążkowiec w poszczególnych dniach eksperymentu. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie  $\pm$ SE, n=6, \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.



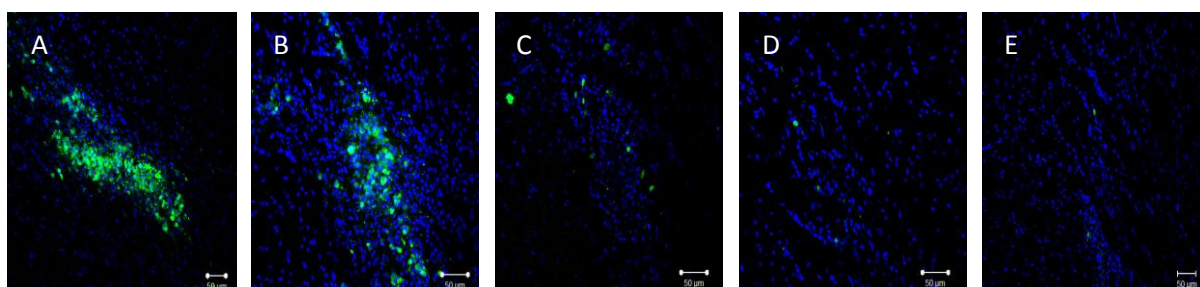
Ryc.16. Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA (kolor zielony) po transplantacji do mózgu szczura z wywołanym podaniem ouabainy uszkodzeniem prążkowiec. Analiza immunohistochemiczna, po zastosowaniu przeciwciała anti-ED1 (A, B, C, D), anti-CD15 (F, G, H), anti-CD5 (I, J, K, L) oraz anti-CD45 (M-P) (kolor czerwony). Obraz w mikroskopie konfokalnym; po 24 godz. (A, E, I, M); 3 dniach (B, F, J, N); 7 dniach (C, G, K, O); 14 dniach (D, H, L, P) od przeszczepu HUCB-NSC do istoty białej dorosłego szczura. Jądra komórek, wyznakowano dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 100  $\mu$ m

Celem dotychczasowych badań było określenie przebiegu procesów zapalnych w odpowiedzi na przeszczep ludzkich neuralnych komórek macierzystych oraz uszkodzenie prążkowiec wywołane podaniem ouabainy w celu opracowania protokołów immunosupresji, pozwalającej na przedłużenie przeżycia przeszczepionych komórek i ich dłuższą obserwację. Opisane powyżej wyniki pokazują, iż przeszczep neuralnych komórek macierzystych wyizolowanych z ludzkiej krwi pępowinowej (HUCB-NSC) u szczurów poddanych udarowi mózgu, powoduje pobudzenie zarówno wrodzonej (makrofagi/mikroglej, astrocyty, neutrofile) jak i adaptacyjnej (limfocyty T i B) odpowiedzi immunologicznej biorcy. Z uwagi na to zastosowaliśmy w naszych dalszych badaniach dwa rodzaje immunosupresji; pierwszą z udziałem cyklosporyny A (CsA) ograniczającej swoiste reakcje biorcy na przeszczep (limfocyty T), drugą z udziałem 3 substancji: CsA, DepoMedrol i Azatioprynę (CsA+Depo+Aza), hamującą zarówno odpowiedź adaptacyjną jak i wrodzoną (limfocyty T i B, makrofagi i neutrofile). Czas obserwacji szczurów poddanych immunosupresji wydłużono do 3 tygodni, licząc na przedłużenie przeżycia przeszczepu.

#### 5.4. Transplantacja HUCB-NSC do mózgu szczurów po uszkodzeniu ouabainą, poddanych immunosupresji cyklosporyną A (CsA)

##### 5.4.1. Identyfikacja HUCB-NSC w mózgu szczurów – biorców przeszczepu po zastosowaniu immunosupresji CsA

Zastosowanie przez nas immunosupresji CsA nie przyniosło oczekiwanych rezultatów w postaci wyraźnego przedłużenia czasu przeżycia przeszczepionych komórek. Pomimo podania większej liczby ludzkich neuralnych komórek macierzystych ( $10^5$ ) niż w przypadku przeszczepu u szczurów bez immunosupresji, żywe komórki dawcy były widoczne w mózgu zwierząt poddanych immunosupresji CsA jedynie przez 14 dni. Ponadto, podane do istoty białej komórki ludzkie przez cały czas obserwacji pozostawały we wszczepie. Nie obserwowano migracji komórek z miejsca, w którym je wstrzyknięto. Procentowy udział poszczególnych fenotypów neuralnych w populacji komórek HUCB-NSC obecnych w mózgu zwierząt, którym podawano CsA pozostawał na tym samym poziomie, co u biorców przeszczepu bez immunosupresji (ryc.17).



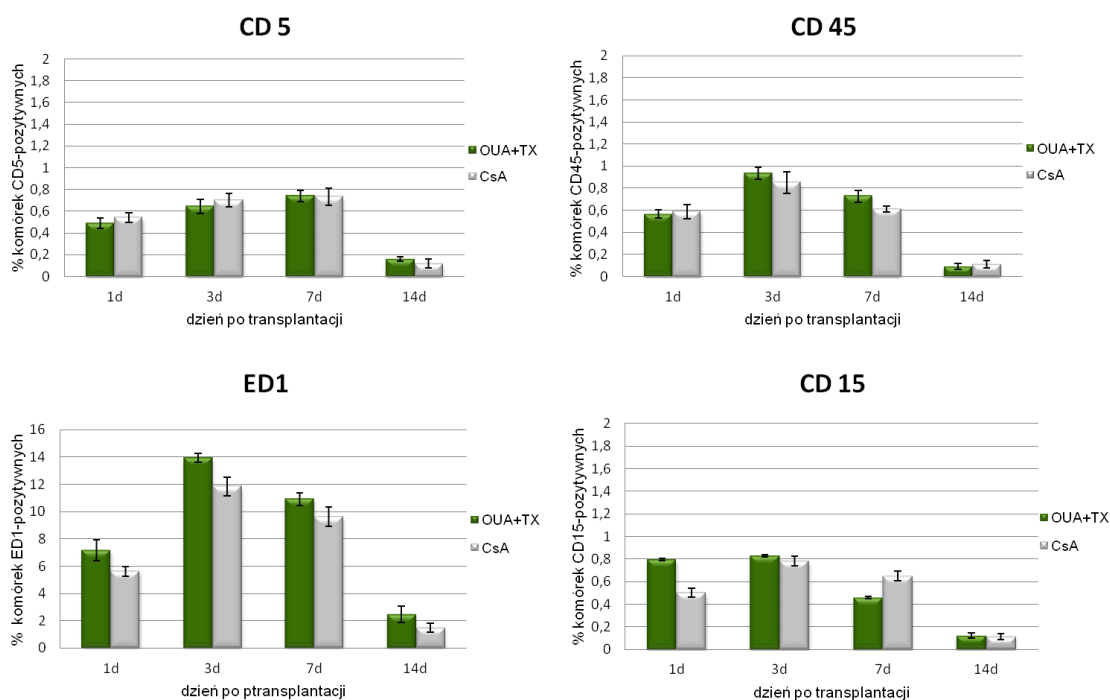
Ryc.17. Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA (kolor zielony) po transplantacji do mózgu szczura z wywołanym podaniem ouabainy, uszkodzeniem prążkowiec po zastosowaniu immunosupresji CsA. Obraz w mikroskopie konfokalnym; po 24 godz. (A); 3 dniach (B); 7 dniach (C); 14 dniach (D) i 21 dniach (E) od przeszczepu HUCB-NSC istoty białej dorosłego szczura. Jądra komórek wyznakowano dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 100 µm.

#### 5.4.2. Odpowiedź immunologiczna w mózgu szczura po przeszczepie komórek HUCB-NSC u zwierząt poddanych immunosupresji CsA

Analiza parametrów immunologicznych w mózgu szczurów po uszkodzeniu ouabainą i przeszczepie neuralnych komórek macierzystych ludzkiej krwi pępowinowej (HUCB-NSC) podczas stosowania CsA wykazała pobudzenie odpowiedzi swoistej mimo stosowania immunosupresji CsA. Po 24 godz od momentu transplantacji HUCB-NSC do istoty białej mózgu szczurów poddanych uszkodzeniu ouabainą w okolicy wszczepu pojawiały się pojedyncze limfocyty T (CD5<sup>+</sup>), widoczne do 14-ego dnia po transplantacji. Obok limfocytów T obecne były limfocyty B (CD45<sup>+</sup>), będące efektorami odpowiedzi humoralnej. Limfocyty B były obserwowane w sąsiedztwie HUCB-NSC pierwszego dnia po transplantacji. Liczba limfocytów B zwiększała się nieznacznie w trzecim dniu obserwacji. Pojedyncze komórki CD45<sup>+</sup> były jeszcze widoczne po 2 tygodniach od podania HUCB-NSC.

U biorców przeszczepu leczonych CsA obserwowano także znaczną odpowiedź nieswoistą. W pierwszym dniu po transplantacji, w sąsiedztwie HUCB-NSC pojawiały się liczne makrofagi i aktywowane komórki mikrogleju (ED1<sup>+</sup>). Po 3 dniach procent komórek ED1<sup>+</sup> był dwukrotnie większy, zmniejszał się stopniowo podczas 21 dni obserwacji. W mózgu biorców przeszczepu HUCB-NSC obserwowano również pojedyncze neutrofile (CD15<sup>+</sup>). Po 14 dniach obecność tych komórek będących podobnie jak w przypadku makrofagów/mikrogleju, elementami odpowiedzi nieswoistej gospodarza, zmniejszała się, a po 3 tygodniach od transplantacji widoczne były nieliczne komórki CD15<sup>+</sup> w miejscu pojedynczych komórek dawcy. Przez cały czas obserwacji reakcji immunologicznej ze strony makrofagów, neutrofile oraz limfocytów T i B towarzyszyła silna aktywacja astrocytów (komórki GFAP<sup>+</sup>) utrzymująca się w tym samym poziomie przez 3 tygodnie po przeszczepie HUCB-NSC.

Reasumując, pomimo zastosowania CsA odpowiedź komórek immunologicznie czynnych w mózgu szczura na przeszczep HUCB-NSC przebiegała podobnie do odpowiedzi w grupie zwierząt niepoddanych immunosupresji. W udziale procentowym poszczególnych populacji komórek biorcy nie zaobserwowano żadnych różnic istotnych statystycznie (ryc.19).



Ryc.19. Wykresy przedstawiają procentowy udział komórek odpowiedzi immunologicznej w mózgu szczura po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą i przeszczepie HUCB-NSC, podczas stosowania CsA, oceniany w poszczególnych dniach eksperymentu. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie  $\pm$ SE,  $n=8$ , \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ .

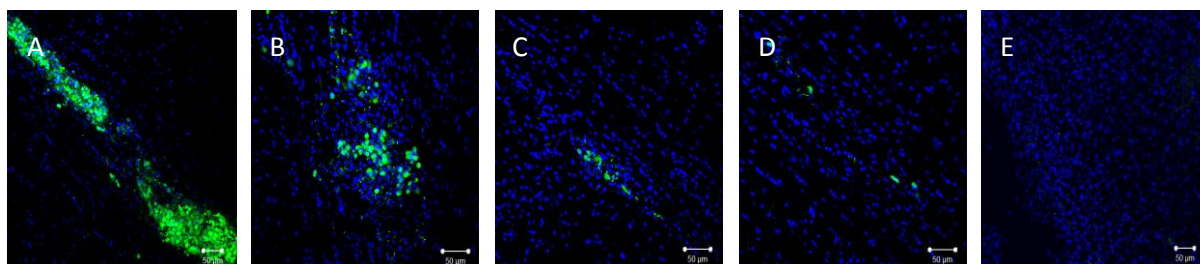
## 5.5. Transplantacja HUCB-NSC do mózgu szczurów po uszkodzeniu ouabainą poddanych trójskładnikowej immunosupresji (CsA+ Depo+Aza)

### 5.5.1. Identyfikacja HUCB-NSC w mózgu szczurów – biorców przeszczepu po zastosowaniu immunosupresji (CsA+ Depo+Aza)

Podobnie jak w przypadku zwierząt leczonych CsA (wyniki badań opisane w rozdziale 5.4), przeszczepione do mózgu szczura HUCB-NSC, pomimo stosowania skojarzonej immunosupresji CsA+Depo+Aza, pozostawały we wszczepie, w większości w stanie niezróżnicowanym. Nie obserwowano ich proliferacji, migracji ani różnicowania. W efekcie podawanie „triplecie immunosupresyjnego” biorcom przeszczepu nie spowodowało przedłużenia przeżycia ludzkich komórek w mózgu szczura (ryc.20).

Ponadto, zastosowanie złożonej immunosupresji (CsA+DepoMedrol+Azatiopryna) było wysoce niekorzystne z punktu widzenia stanu zdrowotnego zwierząt, co utrudniało obserwacje. W naszych badaniach zaobserwowaliśmy, że szczury poddane trójskładnikowej immunosupresji stawały się apatyczne, szybko traciły ciężar ciała, wykazywały objawy chorobowe ze strony układu oddechowego i pokarmowego. Niektóre zwierzęta musiały zostać uśpione przed końcem eksperymentu ze względów humanitarnych z powodu bardzo złego ogólnego stanu zdrowia.

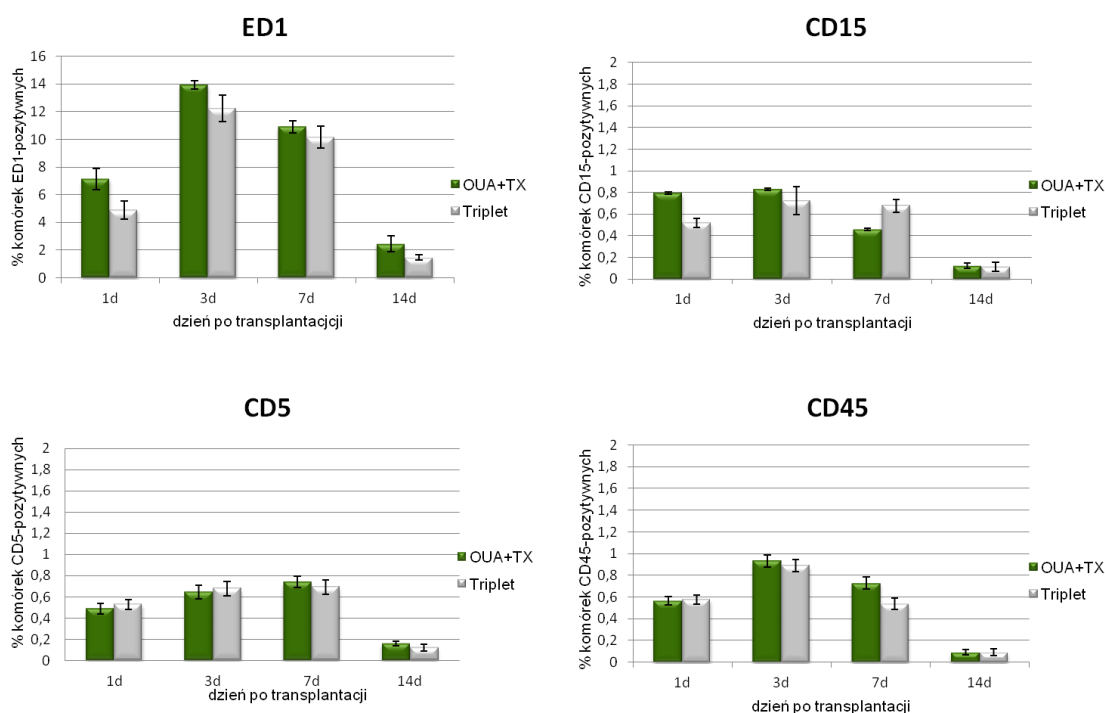




Ryc.20. Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA (kolor zielony) po transplantacji do mózgu szczura z wywołaną podaniem ouabainy uszkodzeniem prążkowiego z zastosowaniem immunosupresji CsA+Aza+Depomedrol. Obraz widoczny w mikroskopie konfokalnym; po 24 godz. (A); 3 dniach (B); 7 dniach (C); 14 dniach (D) i 21 dniach (E) od przeszczepu HUCB-NSC istoty białej dorosłego szczura. Jądra komórek, wyznakowane dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 100 µm

#### 5.5.2. Odpowiedź immunologiczna w mózgu szczurów po uszkodzeniu prążkowiego ouabainą i przeszczepie HUCB-NSC u zwierząt poddanych immunosupresji CsA+Depo+Aza

Zastosowanie „triplethu immunosupresyjnego”, który powinien zmniejszyć aktywację i proliferację komórek zarówno swoistej jak i nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, nie ograniczał reakcji gospodarza na przeszczep HUCB-NSC. Aktywacja komórek mikrogleju (ED1<sup>+</sup>) i astrocytów (GFAP<sup>+</sup>) oraz obecność neutrofilów była obserwowana podczas 2 tygodni od momentu transplantacji HUCB-NSC, a więc do czasu całkowitej eliminacji komórek dawcy. Towarzyszyła temu reakcja humoralna w postaci widocznych limfocytów B i swoista reakcja limfocytów T. Komórki CD45<sup>+</sup> i CD5<sup>+</sup> pojawiały się w pierwszym dniu od momentu przeszczepu i były obecne podczas całego okresu obserwacji do momentu, kiedy w mózgu szczura obserwowano jeszcze żywe komórki dawcy. Szczury poddane immunosupresji z zastosowaniem CsA+DepoMedrol+Azatiopryna nie wykazywały istotnych zmian w liczbie komórek immunologicznie czynnych w porównaniu ze zwierzętami, którym nie podawano leków immunosupresyjnych czy szczurów leczonych CsA (ryc.21).



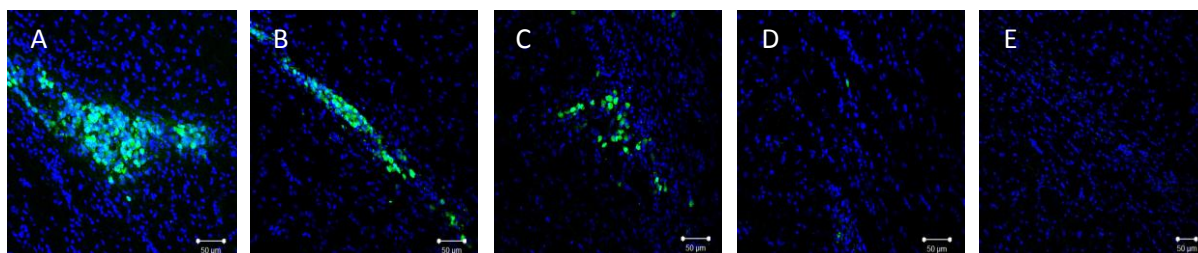
Ryc.21. Wykresy przedstawiają procentowy udział komórek odpowiedzi immunologicznej w mózgu szczura, po uszkodzeniu prądkowia ouabainą i przeszczepie HUCB-NSC, podczas stosowania CsA+Depo+Aza, oceniany w poszczególnych dniach eksperymentu. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie  $\pm$ SE,  $n=8$ , \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ .

## 5.6. Transplantacja HUCB-NSC do mózgu szczura po uszkodzeniu prądkowia ouabainą, poddany zabiegowi pre-immunizacji biorców komórkami dawcy

Brak pozytywnych efektów w postaci przedłużenia przeżycia przeszczepu HUCB-NSC w mózgu szczura pomimo stosowania leków immunosupresyjnych, skłonił nas do wywołania tolerancji szczurów w stosunku do ludzkich neuralnych komórek macierzystych poprzez pre-immunizację biorców komórkami HUCB-NSC w okresie neonatalnym. Inspiracją do tego typu badań były wyniki eksperymentalne Kelly (2009) z udziałem ludzkich płodowych komórek macierzystych przeszczepianych u dorosłych szczurów po wcześniejszej pre-immunizacji zwierząt tuż po ich urodzeniu.

### 5.6.1. Identyfikacja HUCB-NSC w mózgu szczurów – biorców przeszczepu po zastosowaniu preimmunizacji zwierząt w okresie perinatalnym

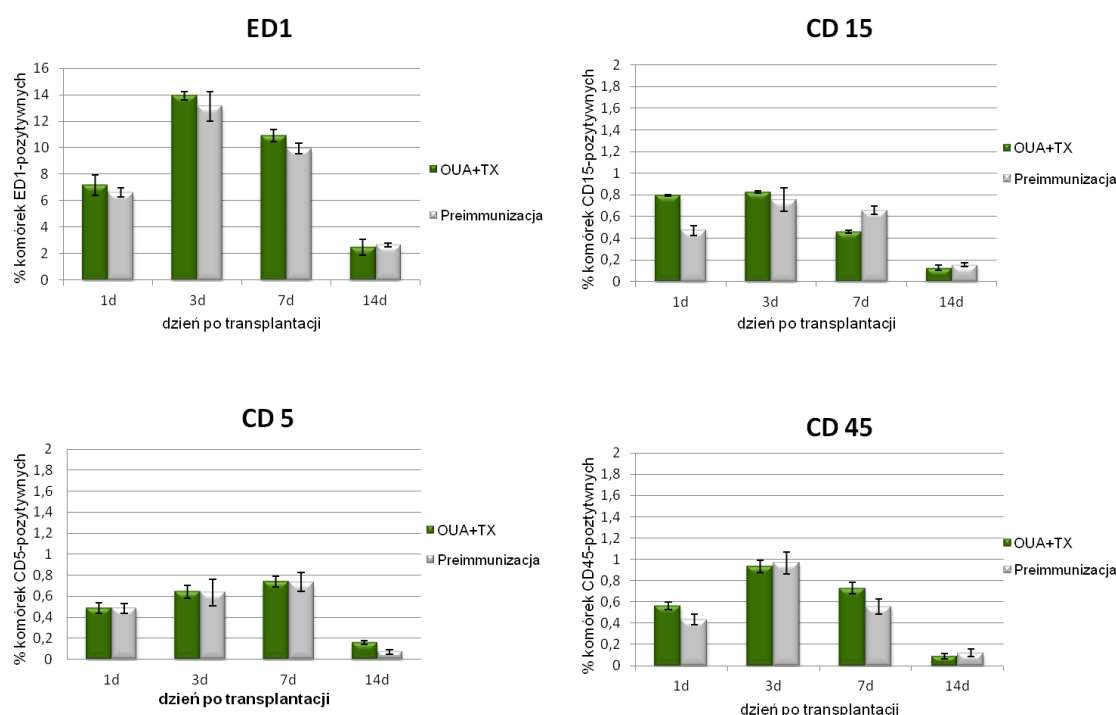
Próby de-sensytyzacji (odczulania) biorców przeszczepu poprzez ich preimmunizację komórkami HUCB-NSC w okresie neonatalnym nie przyniosły oczekiwanego przez nas efektu przedłużenia czasu przeżycia ludzkich neuralnych komórek macierzystych w mózgu szczurów. Mimo zastosowania szczegółowego protokołu pre-immunizacji z doświadczeń opisanych wcześniej przez Kelly, przeszczepione w naszych badaniach u dorosłych szczurów HUCB-NSC, poddanych wcześniej pre-immunizacji tymi komórkami przeżywały w mózgu biorców 14 dni. Po 3 tygodniach od momentu transplantacji HUCB-NSC obserwowaliśmy jedynie pojedyncze żywe komórki dawcy w miejscu ich przeszczepu (ryc.22).



Ryc.22. Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA (kolor zielony) po transplantacji do mózgu szczura z wywołanym podaniem ouabainy uszkodzeniem prążkowiec, po wcześniejszej pre-immunizacji. Obraz widoczny w mikroskopie konfokalnym; po 24 godz. (A); 3 dniach (B); 7 dniach (C); 14 dniach (D) i 21 dniach (E) od przeszczepu HUCB-NSC istoty białej dorosłego szczura. Jądra komórek wyznakowano dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 100 µm.

### 5.6.2. Odpowiedź immunologiczna na przeszczep komórek HUCB-NSC w mózgu szczurów poddanych wcześniej pre-immunizacji komórkami dawcy

Podobnie jak w przypadku immunosupresji (wyniki badań opisane w rozdziałach 5.4.2 i 5.6.2) próba desensytyzacji biorców komórkami dawcy nie ograniczyła odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Potwierdziły to nasze wyniki analizy liczby i aktywności makrofagów/mikrogleju, astrocytów, neutrofilii oraz limfocytów T i B w mózgu szczurów podczas trzytygodniowego czasu obserwacji po transplantacji HUCB-NSC. Nie zaobserwowano zmian zarówno w profilu jak i intensywności przebiegu reakcji ze strony komórek immunologicznie czynnych w porównaniu z grupą szczurów niepoddanych pre-immunizacji (ryc.23).

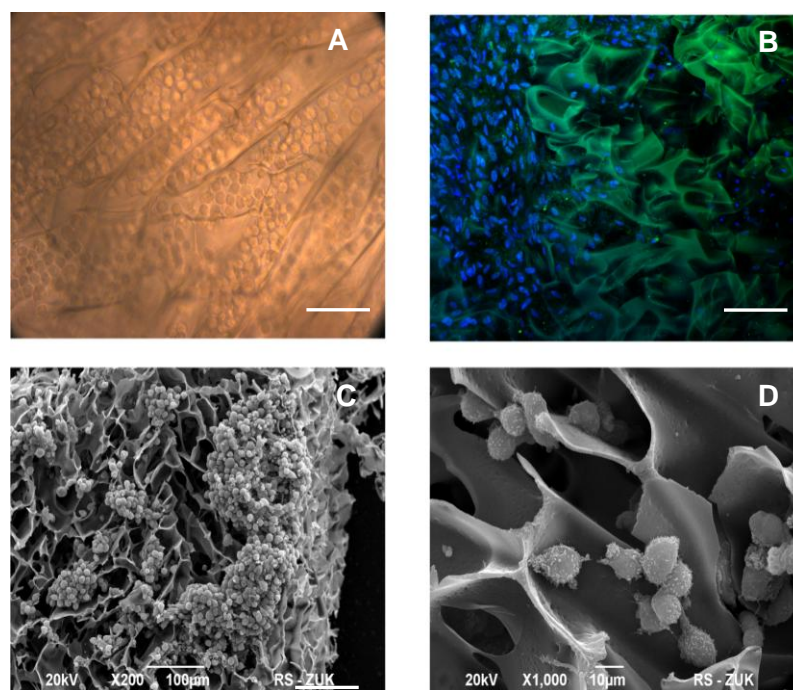


Ryc.23. Wykresy przedstawiają procentowy udział komórek odpowiedzi immunologicznej w mózgu szczura, po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą i przeszczepie HUCB-NSC, z zastosowaną wcześniej pre-immunizacją, oceniany w poszczególnych dniach eksperymentu. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie  $\pm$ SE, n=8, \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

Wyniki naszych dotychczasowych badań wskazują, iż przeszczepianie komórek ludzkich do mózgu szczurów powoduje szybką aktywację układu immunologicznego gospodarza i eliminację ksenogenicznych komórek dawcy. Aby stworzyć dla przeszczepu barierę ochronną uniemożliwiającą jego rozpoznanie i odrzucenie zaplanowaliśmy podawanie komórek HUCB-NSC w postaci trójwymiarowych (3D) agregatów hodowanych uprzednio na platformach (szkieletach) polimerowych. W doświadczeniach wykorzystaliśmy szkielety polimerowe o różnej budowie fizyko-chemicznej. Wstępne badania dotyczyły sprawdzenia poszczególnych szkieletów polimerowych udostępnionych nam przez firmę *Protista* oraz optymalizacji warunków otrzymywania 3D agregatów komórkowych. Mikroskopowa ocena morfologiczna pozwoliła wybrać wysokousięciowane szkielety żelatynowe pokryte lamininą do dalszych doświadczeń. Wybrane platformy żelatynowe były chętniej zasiedlane przez HUCB-NSC i powodowały mniejszą reakcję immunologiczną ze strony tkanki gospodarza po ich transplantacji do mózgu szczura w porównaniu ze szkieletami z dekstranu.

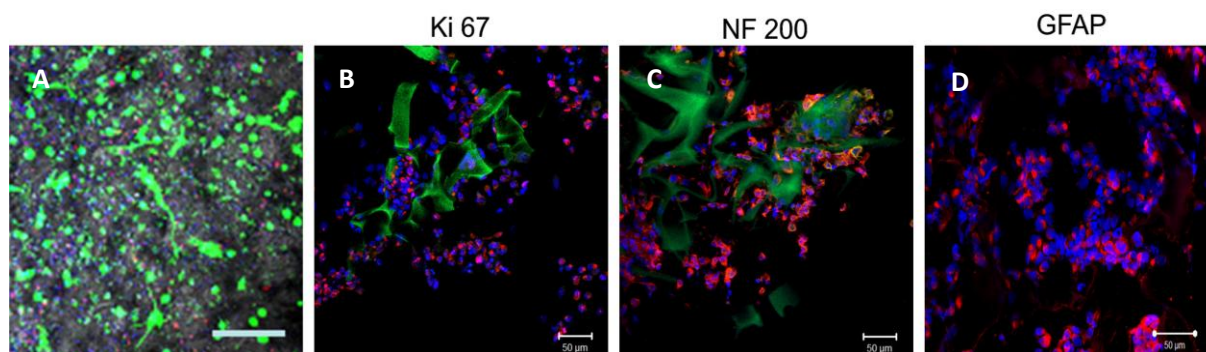
### 5.7. Charakterystyka *in vitro* HUCB-NSC hodowanych na szkieletach żelatynowych pokrytych lamininą przed ich przeszczepieniem do mózgu szczura

Identyfikacja komórek HUCB-NSC, w trójwymiarowych (3D) agregatach na szkieletach żelatynowych pokrytych lamininą (G/L) była przeprowadzana podczas 5-dniowej hodowli. Oceniano zdolność penetracji komórek ludzkich do wewnątrz szkieletu, ich żywotność oraz możliwości różnicowania w kierunku neuralnym. Zdjęcia wykonane przy użyciu mikroskopu świetlnego, konfokalnego oraz elektronowego wykazały obecność komórek HUCB-NSC wewnątrz szkieletów G/L. Stwierdzono wysoką wydajność metody hodowli komórek w obecności badanych struktur 3D sięgająca 460 komórek/mm<sup>3</sup> oraz migrację tych komórek do głębszych warstw szkieletu (ryc.24).



Ryc.24. Rozmieszczenie komórek HUCB-NSC w szkielecie G/L widoczne w mikroskopie świetlnym (A); mikroskopie skaningowym (C, D) oraz w mikroskopie konfokalnym (B) (jądra HUCB-NSC dodatkowo wybarwione barwnikiem Hoechst-33258 (kolor niebieski)). Skala 100  $\mu\text{m}$

Procentowy udział żywych komórek HUCB-NSC obecnych w trójwymiarowych agregatach utworzonych na szkieletach G/L oceniany w barwieniach z użyciem kalceiny AM i jodku propidyny wynosił 75-78%. Badania immunocytochemiczne ujawniły, iż ludzkie neuralne komórki macierzyste po 5 dniach hodowli wykazywały obecność markera Ki67, charakterystycznego dla komórek zdolnych do proliferacji. Wśród HUCB-NSC znajdujących się wewnątrz szkieletów były widoczne komórki pozytywne pod względem ekspresji antygenów typowych dla młodych neuronów (NF-200) oraz astrocytów (GFAP) (ryc.25).

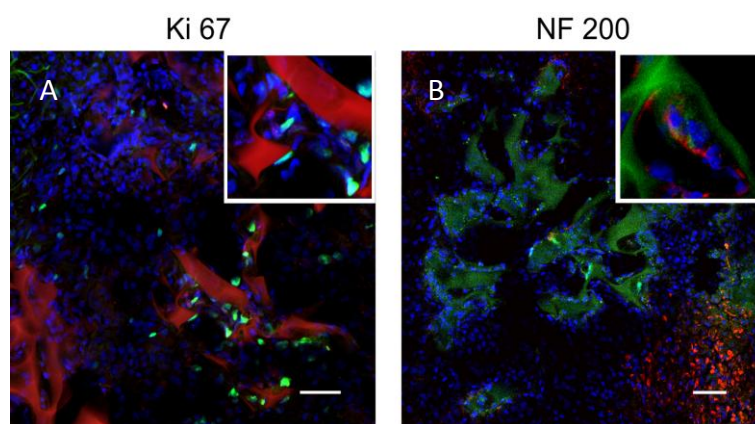


Ryc.25. Obraz w mikroskopie konfokalnym HUCB-NSC hodowanych *in vitro* przez 5 dni na szkieletach G/L. Komórki wybarwione kalceiną AM (kolor zielony) i jodkiem propidyny (kolor czerwony) (A), oraz z zastosowaniem przeciwciał anti-Ki67 (B), anti-NF200 (C), anti-GFAP (D) (kolor czerwony). Jądra HUCB-NSC, wyznakowane dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). A: skala 200  $\mu\text{m}$ , B-D: skala 50  $\mu\text{m}$

## 5.8. Przeszczepianie HUCB-NSC w postaci trójwymiarowych (3D) agregatów komórkowych umieszczonych na szkieletach żelatynowych pokrytych lamininą do mózgu zdrowych szczurów

### 5.8.1. Identyfikacja HUCB-NSC w mózgu zdrowego szczura po ich przeszczepie w postaci 3D agregatów na szkieletach G/L

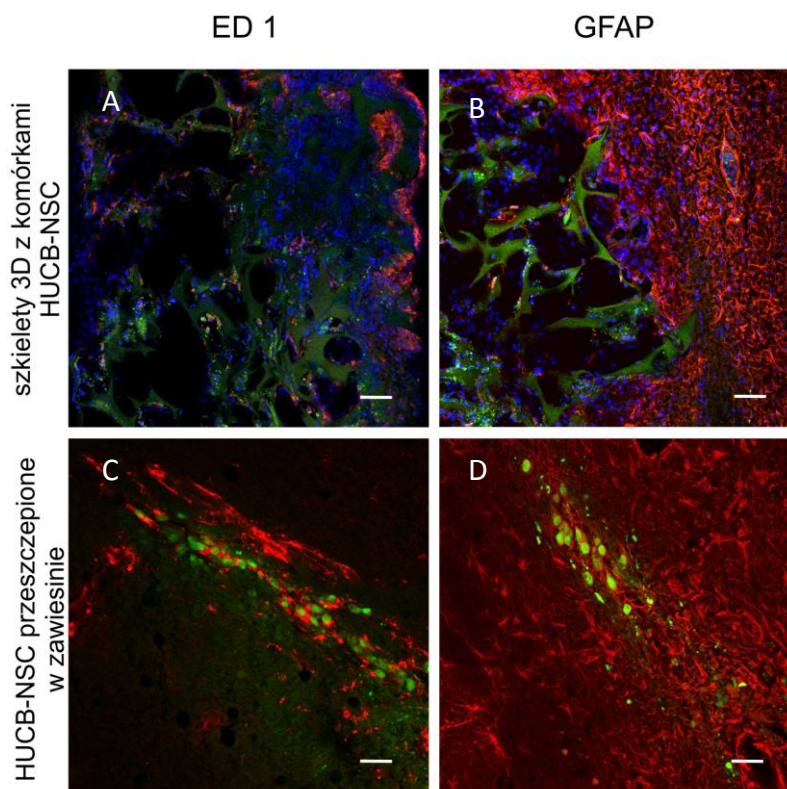
Siedem dni po transplantacji HUCB-NSC w postaci 3D agregatów na szkieletach żelatynowych pokrytych lamininą stwierdzono obecność komórek ludzkich wewnątrz struktur szkieletu. Nie zaobserwowano migracji HUCB-NSC do otaczającej tkanki gospodarza, wszystkie komórki dawcy pozostawały wewnątrz struktur szkieletu. Komórki te wykazywały wysoką żywotność, porównywalną z HUCB-NSC ocenianymi wewnątrz szkieletów G/L podczas ich hodowli *in vitro*. W populacji ludzkich komórek widocznych w przeszczepionych do mózgu zdrowych szczurów 3D agregatach, niektóre z nich wykazywały aktywność mitotyczną (pozytywne pod względem ekspresji markerów proliferacji Ki67) bądź obecność białek charakterystycznych dla wczesnych komórek neuralnych (NF-200) i astrocytów (GFAP) (ryc.26).



Ryc.26. Obraz w mikroskopie konfokalnym komórek HUCB-NSC wyznakowanych przyżyciowo barwnikiem CMFDA (kolor zielony), przeszczepionych w postaci 3D agregatów umieszczonych na szkieletach G/L do kory mózgowej dorosłych szczurów, 7 dni po transplantacji. Analiza immunohistochemiczna komórek ludzkich po zastosowaniu przeciwciał: anti-Ki67 (A) oraz anti-NF200 (B) (kolor czerwony). Jądra komórek wyznakowane dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 50  $\mu$ m

#### 5.8.2. Odpowiedź immunologiczna w mózgu zdrowych szczurów-biorców po przeszczepie 3D struktur G/L zawierających HUCB-NSC

Po 7 dniach od momentu przeszczepienia komórek ludzkich, w miejscu ich podania w postaci 3D agregatów do mózgu zdrowych szczurów, stwierdzono aktywację komórek odpowiedzi immunologicznej biorcy przeszczepu. W tkance nerwowej mózgu szczura pozostającej w bliskim sąsiedztwie przeszczepionych agregatów komórkowych umieszczonych na platformach G/L obserwowano liczne makrofagi/mikroglej (ED1) oraz aktywację astrocytów (GFAP<sup>+</sup>) gospodarza. Liczba komórek odpowiedzi immunologicznej gospodarza była mniejsza w przypadku przeszczepu HUCB-NSC w postaci agregatów 3D w porównaniu ze zdrowymi zwierzętami, którym wstrzyknięto komórki HUCB-NSC w postaci zawiesiny, szczególnie w przypadku ograniczonej liczby makrofagów/mikrogleju (ED1) (ryc.27).

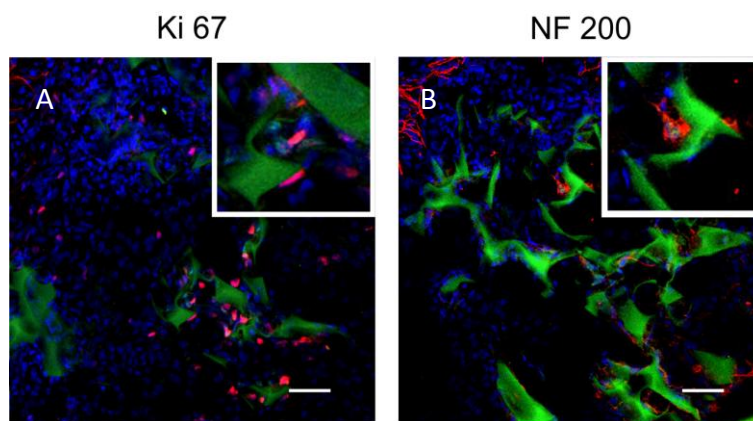


Ryc.27. Analiza immunohistochemiczna komórek odpowiedzi immunologicznej gospodarza na przeszczep HUCB-NSC wyznakowanych przyżyciowo barwnikiem CMFDA (kolor zielony), w 3D agregatach na szkieletach G/L (A, B) oraz w zawiesinie (C, D). Obraz widoczny w mikroskopie konfokalnym, 7dni po transplantacji, po zastosowaniu przeciwciała anti-ED1 (A, C) oraz przeciwciała anti-GFAP (B, D) (kolor czerwony). Jądra komórek wyznakowane dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 50  $\mu$ m

## 5.9. Transplantacja HUCB-NSC w postaci trójwymiarowych (3D) agregatów komórkowych umieszczonych na szkieletach G/L do mózgu szczurów po uszkodzeniu prądkowia ouabainą

### 5.9.1. Identyfikacja HUCB-NSC po ich przeszczepie w postaci 3D agregatów na szkieletach G/L w mózgu szczura po uszkodzeniu prądkowia ouabainą

Komórki HUCB-NSC przeszczepione na szkieletach G/L do mózgu szczurów z uszkodzeniem prądkowia ouabainą, podobnie jak w przypadku ich transplantacji do mózgu zdrowych szczurów, pozostawały wewnątrz 3D agregatów. Podczas 14 dni obserwacji nie stwierdziliśmy migracji HUCB-NSC z przeszczepionych agregatów do otaczającej tkanki nerwowej mózgu gospodarza. Komórki będące wewnątrz agregatów były żywe, a ich liczba przewyższała znacznie liczbę HUCB-NSC przeżywających w mózgu szczurów po przeszczepie w postaci zawiesiny. Liczne podane na platformach G/L komórki ludzkie wykazywały obecność markera Ki67, co świadczy o ich zdolności do proliferacji. Wśród komórek dawcy widocznych wewnątrz szkieletów żelatynowych pokrytych lamininą większość stanowiły komórki progenitorowe, pozytywne pod względem ekspresji Nestyny, a także komórki wykazujące wczesne markery neuronów (NF-200) (ryc.28).

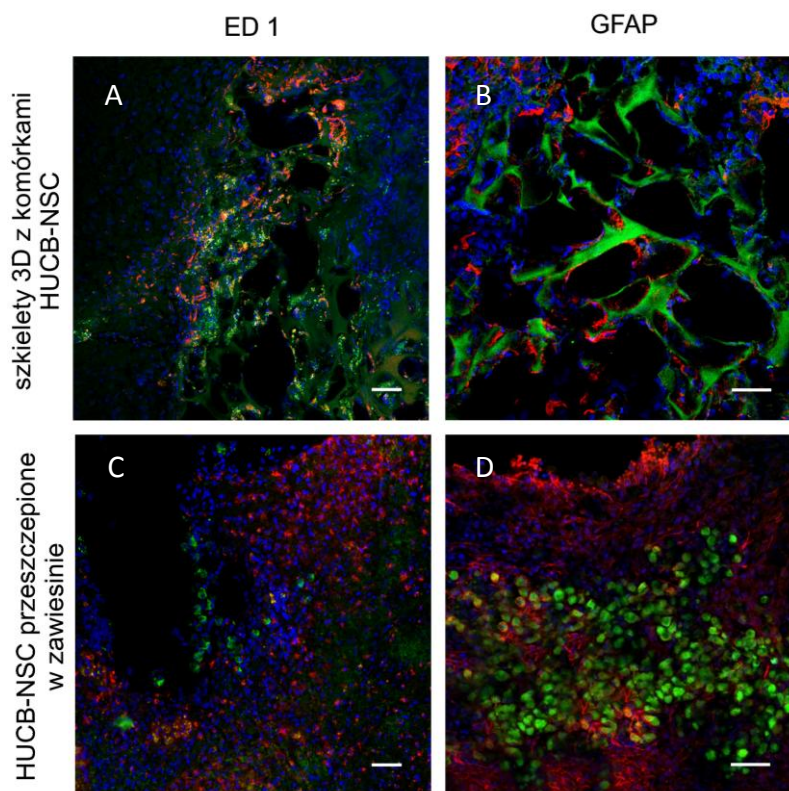


Ryc.28. Obraz w mikroskopie konfokalnym HUCB-NSC wyznakowanych przyżyciowo barwnikiem CMFDA (kolor zielony), przeszczepionych w postaci 3D agregatów umieszczonych na szkieletach G/L do kory mózgowej szczurów z wywołanym podaniem ouabainy uszkodzeniem prążkowiec, 7 dni po transplantacji. Analiza immunohistochemiczna komórek ludzkich po zastosowaniu przeciwciał: anti-Ki67 (A) oraz anti-NF200 (B) (kolor czerwony). Jądra komórek wyznakowane dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 50 µm

#### 5.9.2. Odpowiedź immunologiczna w mózgu szczurów po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą na przeszczep 3D struktur G/L zawierających HUCB-NSC

Siedem dni po transplantacji komórek HUCB na szkieletach G/L do mózgu szczurów po uprzednim uszkodzeniu prążkowiec ouabainą obserwowano nacieki komórek zapalnych wokół przeszczepionych 3D agregatów. Badania immunohistochemiczne wykazały obecność aktywowanych makrofagów/mikrogleju (ED1) oraz astrocytów (GFAP). Komórki immunologicznie czynne gospodarza widoczne były przede wszystkim w tkance bezpośrednio otaczającej przeszczepiony szkielet z umieszczonymi komórkami HUCB-NSC. Nie obserwowano komórek biorcy wewnątrz szkieletu G/L. Reakcja immunologiczna była mniejsza niż w grupie zwierząt po uszkodzeniu mózgu ouabainą poddanych repopulacji komórkami HUCB-NSC w zawieszynie. Ponadto wydaje się, iż brak bezpośredniego dostępu komórek żernych szczura zatrzymywanych przez struktury szkieletu, do komórek dawcy zapewniał komórkom ludzkim dłuższe przeżycie po ich transplantacji (ryc.29).





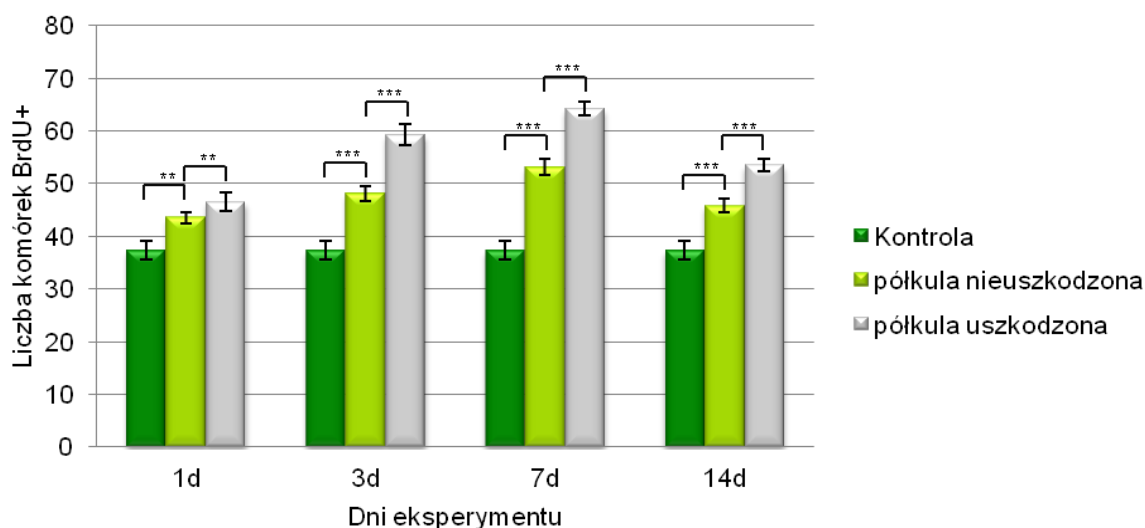
Ryc.29. Analiza immunohistochemiczna odpowiedzi immunologicznej biorcy w reakcji na przeszczep komórek HUCB-NSC wyznakowanych CMFDA, (kolor zielony) po zastosowaniu przeciwciał anti-ED1 (A, C; kolor czerwony) oraz przeciwciał anti-GFAP (B, D; kolor czerwony). Komórki HUCB-NSC na szkieletach G/L (A, B) lub w zawieszynie (C,D) przeszczepione do mózgu dorosłych szczurów z uszkodzeniem prążkowiec ouabainą, 7 dni po transplantacji. Jądra komórek wyznakowane dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 50  $\mu$ m

## 5.10. Analiza endogennej neurogenezy w mózgu szczurów po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą

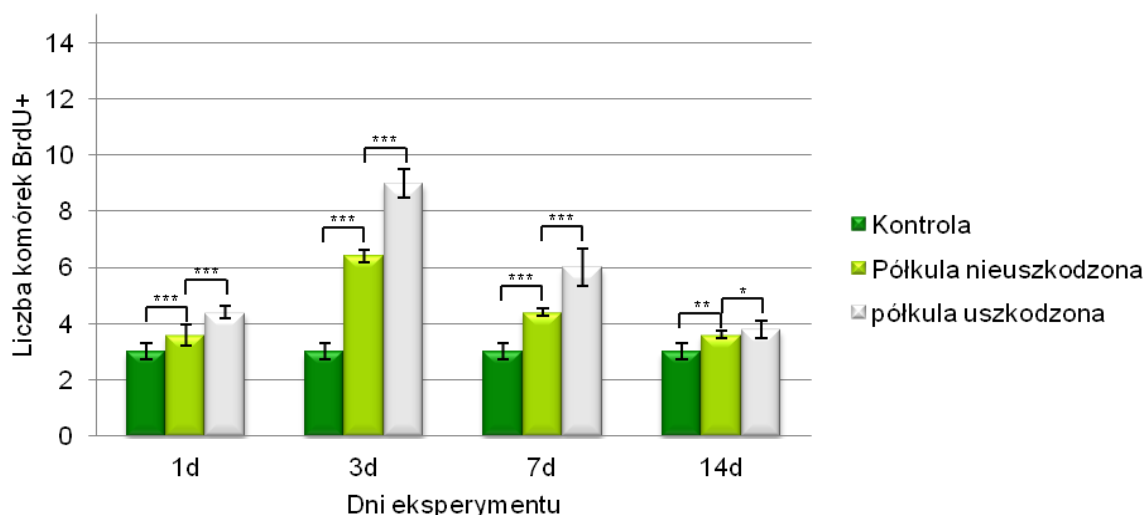
Analiza rejonów aktywnej endogennej neurogenezy, jakimi u gryzoni jest strefa okołokomorowa (SVZ) i strefa podziarnista zakrętu zębatego hipokampa (SGZ) stanowiła kolejny etap przedstawionych badań.

### 5.10.1. Ocena proliferacji endogennych progenitorów neuralnych w strefach neurogennych mózgu

Uszkodzenie prążkowiec u dorosłych szczurów wywołane podaniem ouabainy powoduje wzrost liczby komórek wykazujących marker charakterystyczny dla komórek proliferujących (BrdU<sup>+</sup>) w SVZ i SGZ, co świadczy o zwiększonej proliferacji komórek w tych rejonach mózgu w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. Już od pierwszego dnia po uszkodzeniu wzrost ten był widoczny i istotny statystycznie. Różnica ta utrzymywała się do 14 dnia trwania eksperymentu. Dodatkowo, obserwowano różnicę pomiędzy półkulą uszkodzoną i nieuszkodzoną, ze zwiększoną liczbą komórek BrdU<sup>+</sup> po stronie tożsamej z uszkodzeniem ouabainą (ipsilateralnej). Te różnice, utrzymujące się przez cały czas trwania eksperymentu, były istotne statystycznie (ryc.30; 31).



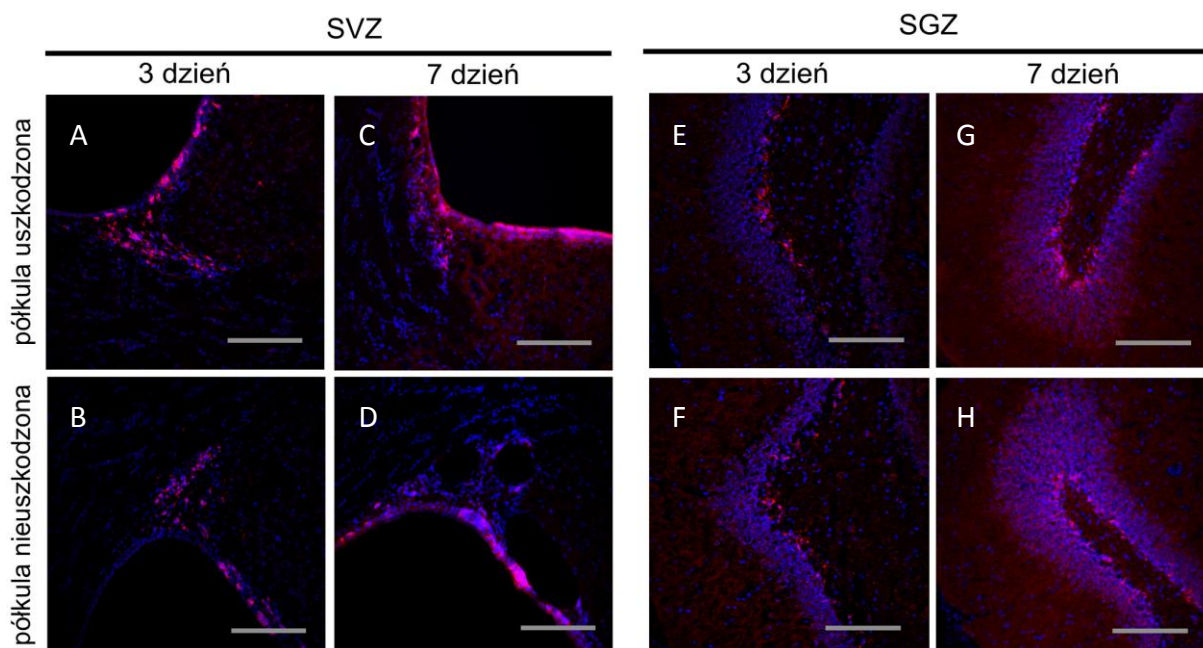
Ryc.30. Wykres przedstawia liczbę komórek BrdU<sup>+</sup> w strefie **SVZ**, w półkuli ipsi- i kontr-lateralnej szczurów, po uszkodzeniu mózgu ouabainą, w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie  $\pm$ SE, n=5, \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.



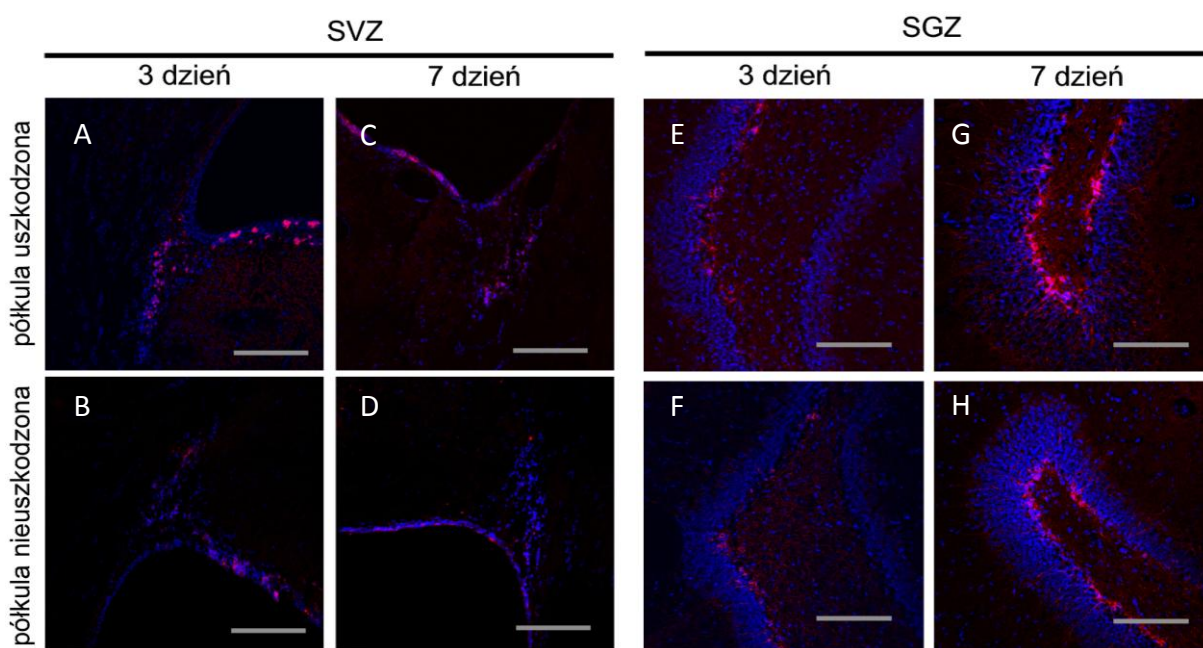
Ryc.31. Wykres przedstawia liczbę komórek BrdU<sup>+</sup> w strefie **SGZ**, w półkuli ipsi- i kontr-lateralnej szczurów po uszkodzeniu mózgu ouabainą, w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie  $\pm$ SE, n=5, \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

#### 5.10.2. Identyfikacja nowopowstałych neuroblastów w strefach neurogennych mózgu szczurów po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą

Wzrostowi liczby komórek BrdU<sup>+</sup>, w obydwu analizowanych strefach neurogennych mózgu szczurów po podaniu ouabainy towarzyszył wzrost liczby komórek wykazujących obecność markerów charakterystycznych dla migrujących neuroblastów (DCX oraz PSA-NCAM) w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Największe różnice liczbowe obserwowano w trzecim i siódmym dniu eksperymentu. Ponadto po 7 dniach od momentu podania ouabainy nowopowstałe komórki DCX<sup>+</sup> oraz PSA-NCAM<sup>+</sup> migrowały ze strefy okołokomorowej w kierunku miejsca uszkodzenia tkanki. Po 14 dniach liczba migrujących neuroblastów była niższa niż w dniu 7, co odpowiadało zmniejszonej proliferacji komórek (mniejsza liczba komórek BrdU<sup>+</sup>) w rejonie SVZ w tym dniu (ryc.32; 33).



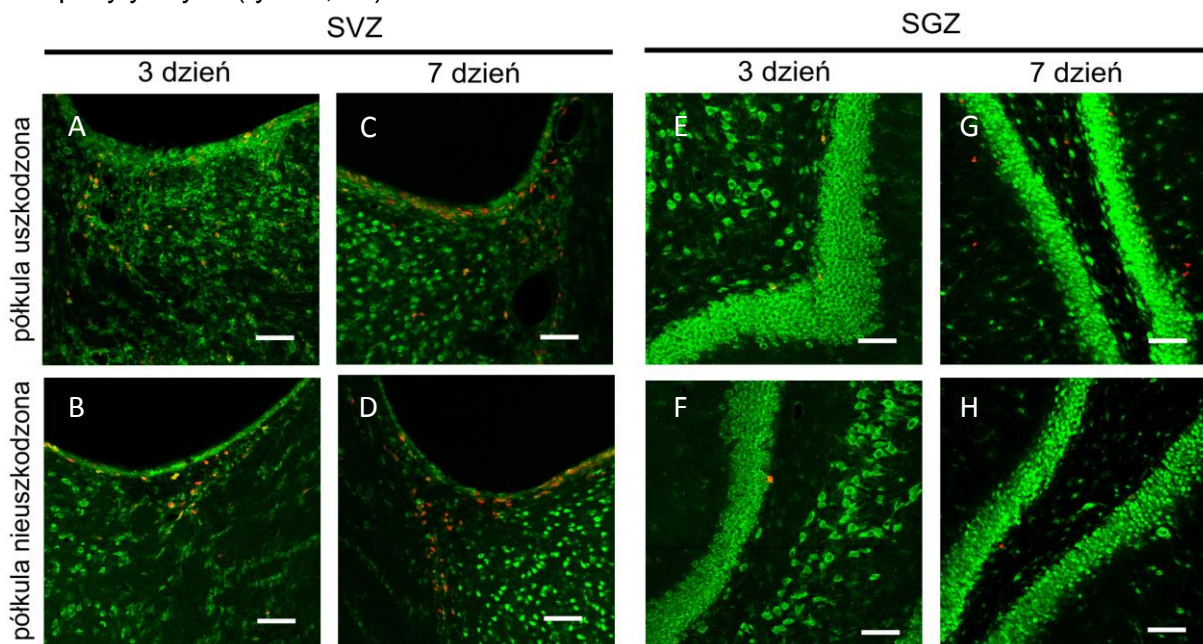
Ryc.32. Analiza procesów endogennej neurogenezy, u dorosłych szczurów po uszkodzeniu mózgu ouabainą. Badania immunohistochemiczne skrawków mózgu szczura, z zastosowaniem przeciwciał anti-DCX (kolor czerwony) w **SVZ** półkuli uszkodzonej (A, C) i nieuszkodzonej (B, D) oraz w **SGZ** półkuli uszkodzonej (E, G) i nieuszkodzonej (F, H) po 3 i 7 dniach od podania ouabainy. Jądra komórek wyznakowane dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 150  $\mu$ m



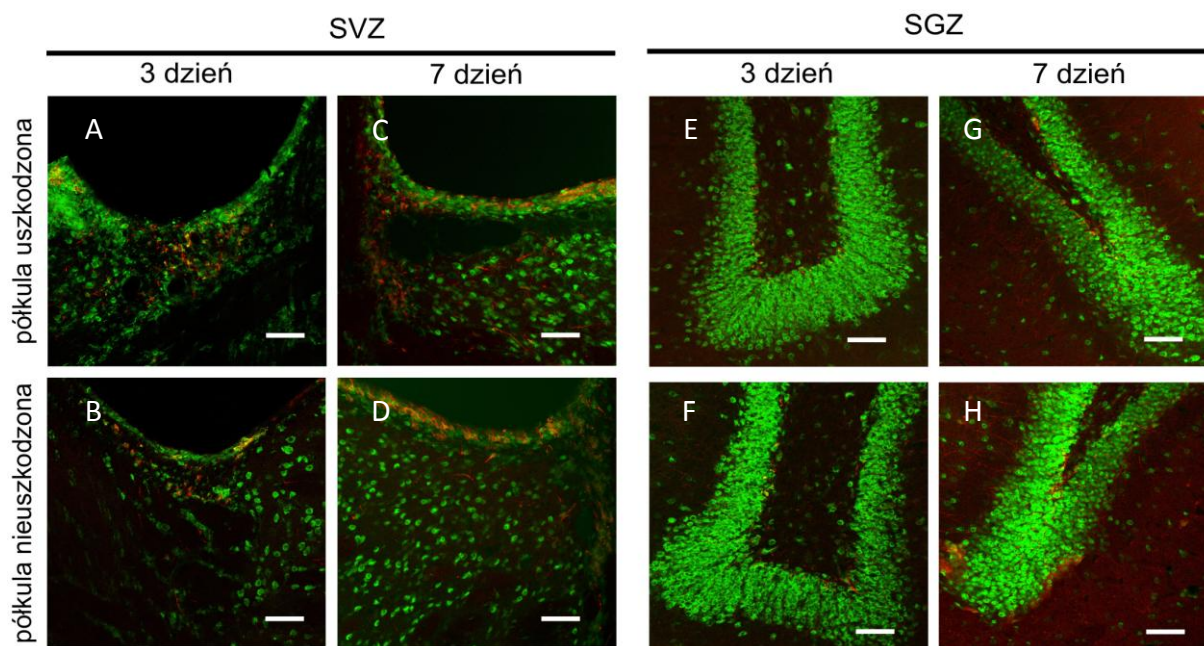
Ryc.33. Analiza procesów endogennej neurogenezy, u dorosłych szczurów po uszkodzeniu mózgu ouabainą. Badania immunohistochemiczne skrawków mózgu szczura, z użyciem przeciwciał anti-PSA-NCAM (kolor czerwony) w **SVZ** półkuli uszkodzonej (A, C) i nieuszkodzonej (B, D) oraz w **SGZ** półkuli uszkodzonej (E, G) oraz nieuszkodzonej (F, H) po 3 i 7 dniach od momentu padania ouabainy. Jądra komórek wyznakowane dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 150  $\mu$ m

### 5.10.3. Aktywność metaloproteinaz w strefach neurogennych mózgu szczurów po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą

Aktywność metaloproteinaz 2 i 9 (MMP 2/9) w strefach neurogennych mózgu szczurów eksperymentalnych oceniana była metodą zymografii *in situ*. Badania te wykazały wzrost aktywności żelatynaz u zwierząt z uszkodzeniem prążkowiec ouabainą i szczurów, którym po podaniu ouabainy przeszczepiono komórki HUCB-NSC, w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Aktywność MMP 2/9 w grupie eksperymentalnej szczurów z wywołanym uszkodzeniem prążkowiec i przeszczepem komórek ludzkich zmieniała się w poszczególnych dniach trwania eksperymentu. Stopniowy wzrost aktywności badanych metaloproteinaz od 1-ego do 7-ego dnia po transplantacji HUCB-NSC był szczególnie widoczny w strefie SVZ. W kolejnych dniach obserwacji aktywność MMP 2/9 zmniejszała się, a po dwóch tygodniach od przeszczepu była porównywalna do aktywności obserwowanej w grupie zwierząt kontrolnych. Zastosowanie zymografii *in situ* ujawniło, że w obydwu badanych strefach neurogennych, SVZ oraz SGZ, aktywność MMP 2/9 zlokalizowana jest głównie w jądrach komórkowych. Komórki proliferujące (BrdU<sup>+</sup>) wykazywały nieznacznie podwyższoną aktywność metaloproteinaz. W niektórych komórkach w strefie SVZ widoczna była aktywność MMP 2/9 także w cytoplazmie. Szczególnie wyraźnie zaznaczona była w neuroblastach migrujących z SVZ w obrębie donosowego strumienia migracji (RMS; *rostral migratory stream*) w kierunku opuszki węchowej i w komórkach migrujących w kierunku miejsca uszkodzenia mózgu. Neuroblasty (DCX<sup>+</sup>) wykazywały zwiększoną aktywność MMP 2/9, w porównaniu do pozostałych komórek otaczającej tkanki, widoczną zarówno w cytoplazmie oraz w wypustkach. Dodatkowo obserwowano aktywność metaloproteinaz w przestrzeni zewnątrzkomórkowej wokół komórek DCX-pozytywnych (ryc.34; 35).



Ryc.34. Analiza proliferacji komórek i aktywności metaloproteinaz 2 i 9, w strefach neurogennych szczurów po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą. Badania immunohistochemiczne skrawków mózgu szczura przeprowadzone z użyciem przeciwciał anti-BrdU (kolor czerwony) oraz metody zymografii *in situ* (kolor zielony) w SVZ półkuli uszkodzonej (A, C) i nieuszkodzonej (B, D) oraz w SGZ półkuli uszkodzonej (E, G) i nieuszkodzonej (F, H) po 3 i 7 dniach od momentu podania ouabainy. Skala 100  $\mu$ m

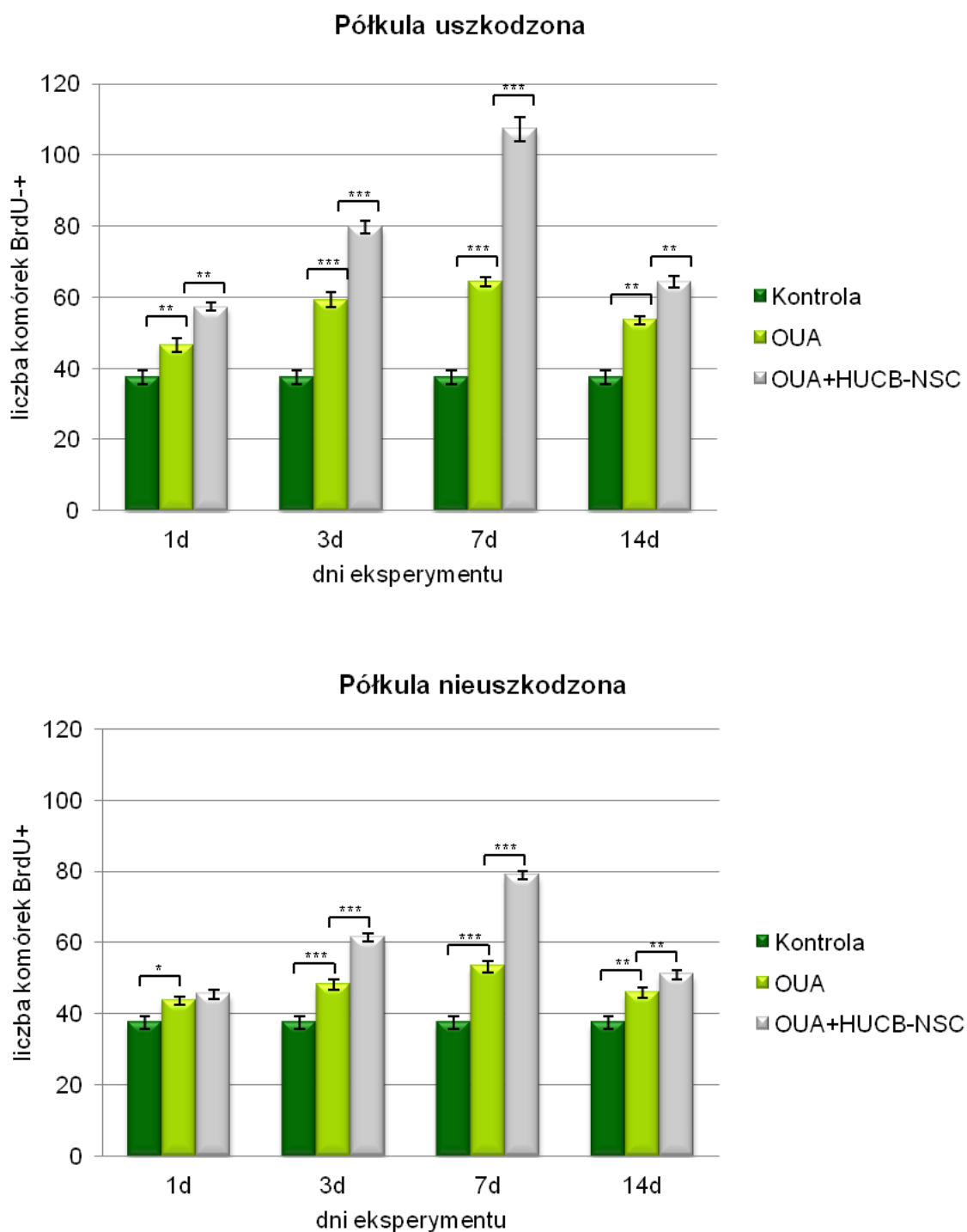


Ryc.35. Ocena nowopowstałych neuroblastów i aktywności metaloproteinaz 2 i 9, w strefach neurogennych szczurów po uszkodzeniu mózgu ouabainą. Badania immunohistochemiczne skrawków mózgu szczura przeprowadzone z użyciem przeciwciał anti-DCX (kolor czerwony) oraz metody zymografii *in situ* (kolor zielony) w SVZ półkuli uszkodzonej (A, C) i nieuszkodzonej (B, D) oraz w SGZ półkuli uszkodzonej (E, G) i nieuszkodzonej (F, H) po 3 i 7 dniach od momentu podania ouabainy. Skala 100  $\mu$ m

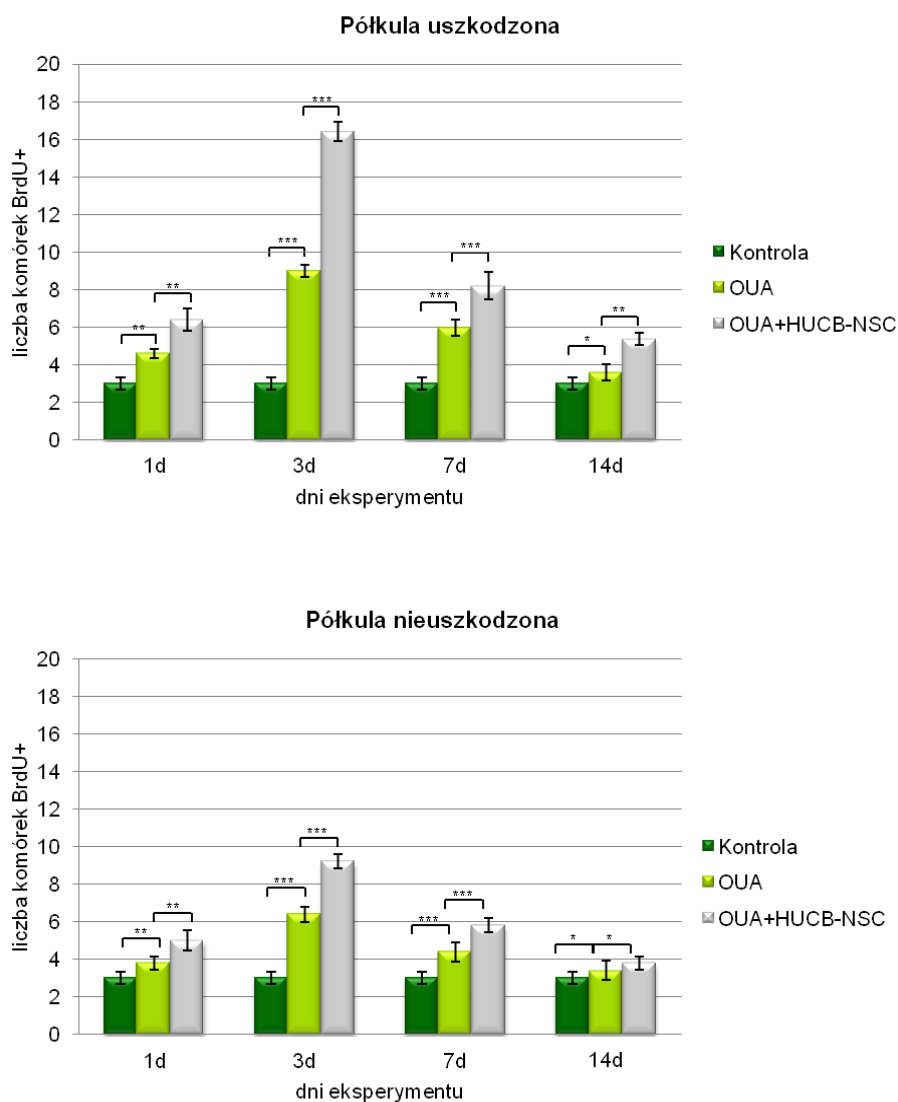
## 5.11. Analiza endogennej neurogenyzy w mózgu szczurów, którym przeszczepiono HUCB-NSC po wcześniejszym uszkodzeniu prążkowiec ouabainą

### 5.11.1. Ocena proliferacji endogennych progenitorów neuralnych w strefach SVZ i SGZ po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą i transplantacji HUCB-NSC

Proliferacja komórek w strefach neurogennych, SVZ oraz SGZ, oceniana była na podstawie wbudowania BrdU do dzielących się komórek. Nasze badania wykazały wzrost liczby proliferujących komórek w mózgu zwierząt z wywołanym uszkodzeniem prążkowiec i przeszczepionymi do istoty białej komórkami HUCB-NSC w porównaniu do zwierząt kontrolnych i zwierząt po ischemii, które nie otrzymały przeszczepu. Liczba komórek BrdU-pozytywnych w mózgu szczurów po transplantacji HUCB-NSC zwiększała się aż do 7-ego dnia obserwacji. Podwyższony poziom proliferacji obserwowany był nie tylko w półkuli tożsamej z uszkodzeniem, ale również po stronie kontrlateralnej, choć zmiany te były mniej widoczne niż w półkuli ipsilateralnej. Liczba komórek proliferujących w strefie okołokomorowej SVZ była znacznie wyższa w porównaniu do strefy SGZ (ryc. 36; 37).



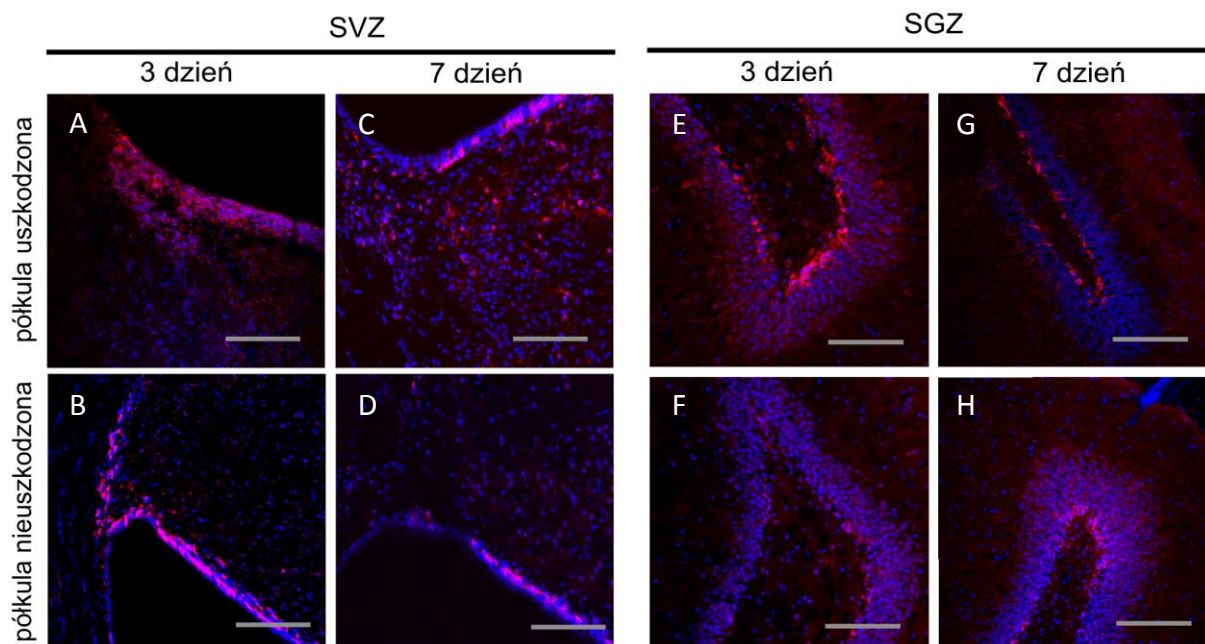
Ryc.36. Wykres przedstawia liczbę komórek proliferujących (BrdU<sup>+</sup>) w strefie **SVZ**, w półkuli uszkodzonej i nieuszkodzonej szczurów po podaniu ouabainy i u zwierząt, którym po ischemii przeszczepiono komórki HUCB-NSC, w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie  $\pm$ SE, n=5, \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.



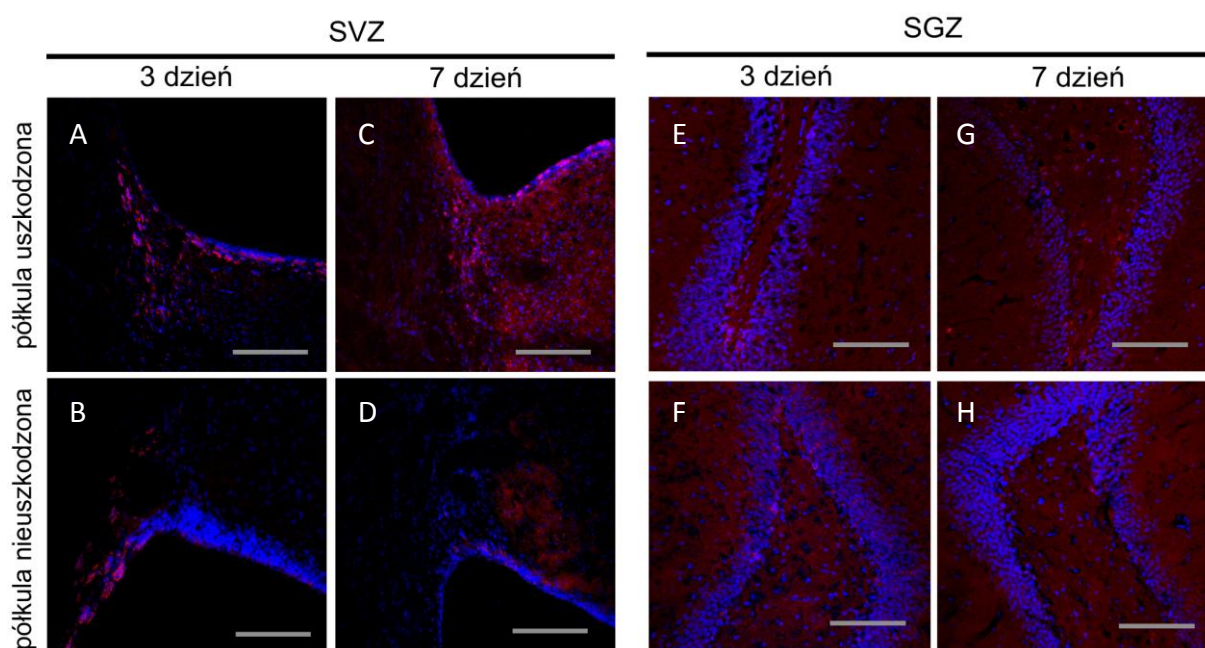
Ryc.37. Wykres przedstawia liczbę komórek proliferujących (BrdU<sup>+</sup>) w strefie **SGZ**, w półkuli uszkodzonej i nieuszkodzonej szczurów po podaniu ouabainy i u zwierząt, którym po ischemii przeszczepiono komórki HUCB-NSC, w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie  $\pm$ SE, n=5, \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

#### 5.11.2. Identyfikacja nowopowstałych neuroblastów w strefach neurogennych mózgu szczurów po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą i transplantacji HUCB-NSC

Pierwszego dnia po przeszczepie HUCB-NSC szczurom, u których wcześniej wykonano uszkodzenie mózgu, wraz ze wzrostem liczby komórek BrdU<sup>+</sup> obserwowano wzrost liczby neuroblastów zdolnych do migracji (DCX<sup>+</sup> i PSA-NCAM<sup>+</sup>) w SVZ i SGZ w porównaniu ze zwierzętami bez przeszczepu HUCB-NSC. Wzrost ten był wyraźniej zaznaczony w półkuli ipsilateralnej niż w półkuli kontralateralnej. Trzeciego dnia po transplantacji ludzkich progenitorów neuralnych widoczna była migracja komórek DCX<sup>+</sup> i PSA-NCAM<sup>+</sup> ze strefy SVZ w kierunku lezji, szczególnie zaznaczona w półkuli tożsamej z uszkodzeniem. Siedem dni po transplantacji HUCB-NSC liczba migrujących komórek w półkuli ipsilateralnej była większa w porównaniu z dniem trzecim. Po 14 dniach od momentu przeszczepu HUCB-NSC nie obserwowano różnic w liczbie komórek DCX<sup>+</sup> oraz PSA-NCAM<sup>+</sup> w strefach neurogennych półkuli uszkodzonej i nieuszkodzonej (ryc.38; 39).



Ryc.38. Analiza procesów endogennej neurogenezy u szczurów, którym przeszczepiono HUCB-NSC po wcześniejszym uszkodzeniu mózgu ouabainą. Badania immunohistochemiczne skrawków mózgu szczura przeprowadzone z użyciem przeciwciał anti-DCX (kolor czerwony) w SVZ półkuli uszkodzonej (A, C) i nieuszkodzonej (B, D) oraz w SGZ półkuli uszkodzonej (E, G) i nieuszkodzonej (F, H) po 3 i 7 dniach od przeszczepu. Jądra komórek wybarwione dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 100  $\mu$ m

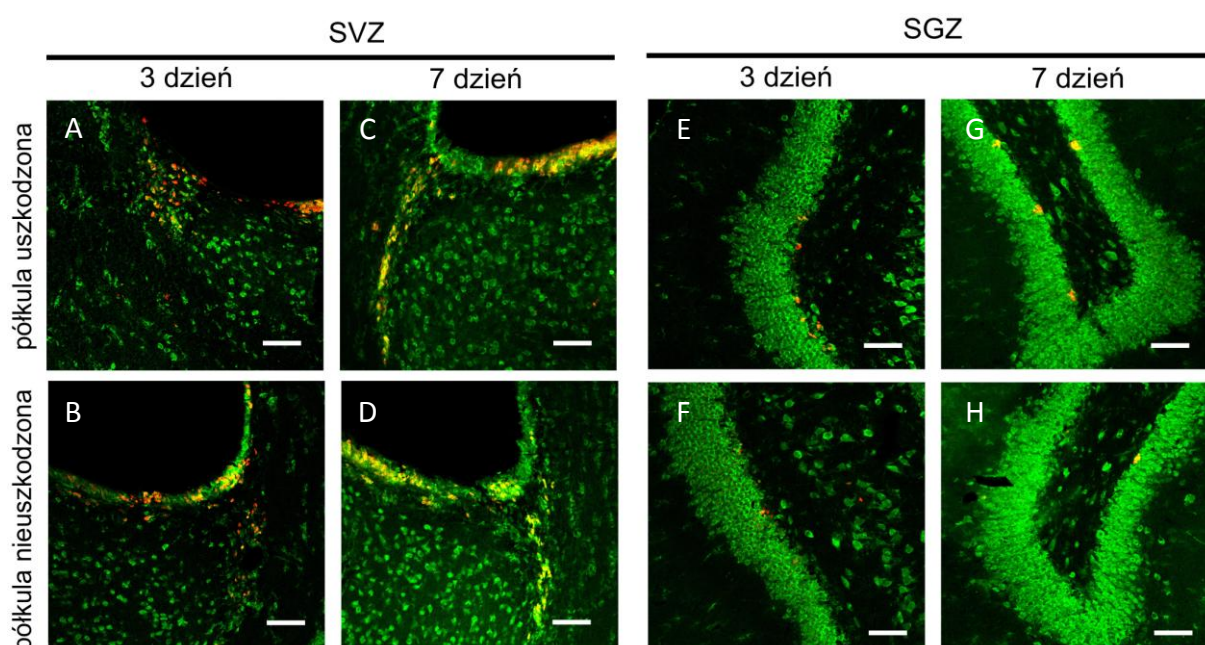


Ryc.39. Analiza procesów endogennej neurogenezy u szczurów, którym przeszczepiono HUCB-NSC po wcześniejszym uszkodzeniu mózgu ouabainą. Badania immunohistochemiczne skrawków mózgu szczura przeprowadzone z użyciem przeciwciał anti-PSA-NCAM (kolor czerwony) w SVZ półkuli uszkodzonej (A, C) i nieuszkodzonej (B, D) oraz w SGZ półkuli uszkodzonej (E, G) i nieuszkodzonej (F, H) po 3 i 7 dniach od przeszczepu. Jądra komórek wyznakowane dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 100  $\mu$ m

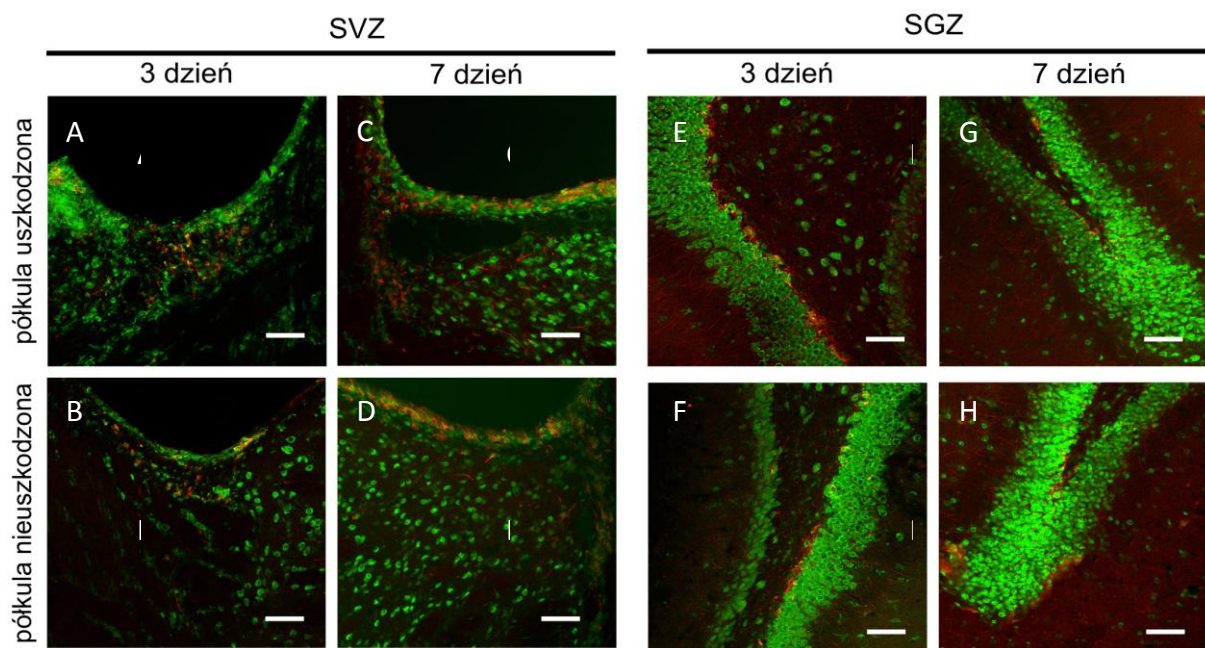


### 5.11.3. Aktywność metaloproteinaz w mózgu szczurów, którym przeszczepiono HUCB-NSC po wcześniejszym uszkodzeniu prążkowiec ouabainą

Ocena aktywności metaloproteinaz metodą zymografii *in situ* wykazała wzrost intensywności reakcji MMP2/ MMP9 w rejonie SVZ u zwierząt poddanych uszkodzeniu mózgu i repopulacji HUCB-NSC w porównaniu do zwierząt kontrolnych. Komórki wykazujące obecność markerów BrdU i DCX charakteryzowały się większą aktywnością MMP niż inne obecne w tkance szczura. W komórkach znajdujących się w obszarach SVZ oraz SGZ aktywność metaloproteinaz zlokalizowana była przede wszystkim w jądrze. Niektóre z komórek w SVZ wykazywały aktywność MMP2/9 także w cytoplazmie. W komórkach DCX<sup>+</sup> znajdujących się w donosowym strumieniu migracji (RMS), a także w neuroblastach migrujących z SVZ do miejsca uszkodzenia, obserwowano wysoką aktywność MMP2/9 w ciele komórki i w wypustkach oraz na zewnątrz komórek w otaczającej je tkance. Aktywność metaloproteinaz w migrujących neuroblastach była wyższa niż w pozostałych komórkach mózgu. W strefie SGZ aktywność MMP2/9 zlokalizowana była tylko w jądrach komórek BrdU<sup>+</sup> i DCX<sup>+</sup>, nie obserwowano jej w cytoplazmie komórek ani w otaczającej tkance (ryc.40; 41).



Ryc.40. Analiza proliferacji komórek i aktywności metaloproteinaz 2 i 9 w strefach neurogennych mózgu szczurów, którym przeszczepiono HUCB-NSC po wcześniejszym uszkodzeniu mózgu ouabainą. Badania immunohistochemiczne skrawków mózgu szczura z użyciem przeciwciał anti-BrdU (kolor czerwony) i metody zymografii *in situ* (kolor zielony) w SVZ półkuli uszkodzonej (A, C) i nieuszkodzonej (B, D) oraz w SGZ półkuli uszkodzonej (E, G) i nieuszkodzonej (F, H) po 3 i 7 dniach od podania ouabainy. Skala 100  $\mu$ m



Ryc.41. Ocena nowopowstałych neuroblastów i aktywności metaloproteinaz 2 i 9 w strefach neurogennych mózgu szczurów, którym przeszczepiono HUCB-NSC po wcześniejszym uszkodzeniu mózgu ouabainą. Badania immunohistochemiczne skrawków mózgu szczura z użyciem przeciwciał anti-DCX (kolor czerwony) i metody zymografii *in situ* (kolor zielony) w SVZ półkuli uszkodzonej (A, C) i nieuszkodzonej (B, D) oraz w SGZ półkuli uszkodzonej (E, G) i nieuszkodzonej (F, H) po 3 i 7 dniach od momentu podania ouabainy. Skala 100  $\mu$ m

## 5.12. Obecność czynników neurotroficznych w mózgu szczurów poddanych zabiegowi uszkodzenia prążkowiego i transplantacji komórek HUCB-NSC

Kolejny etap badań dotyczył oceny ekspresji czynników troficznych w mózgu szczura, produkowanych zarówno przez komórki szczura jak i przeszczepione ludzkie neuralne komórki macierzyste HUCB-NSC.

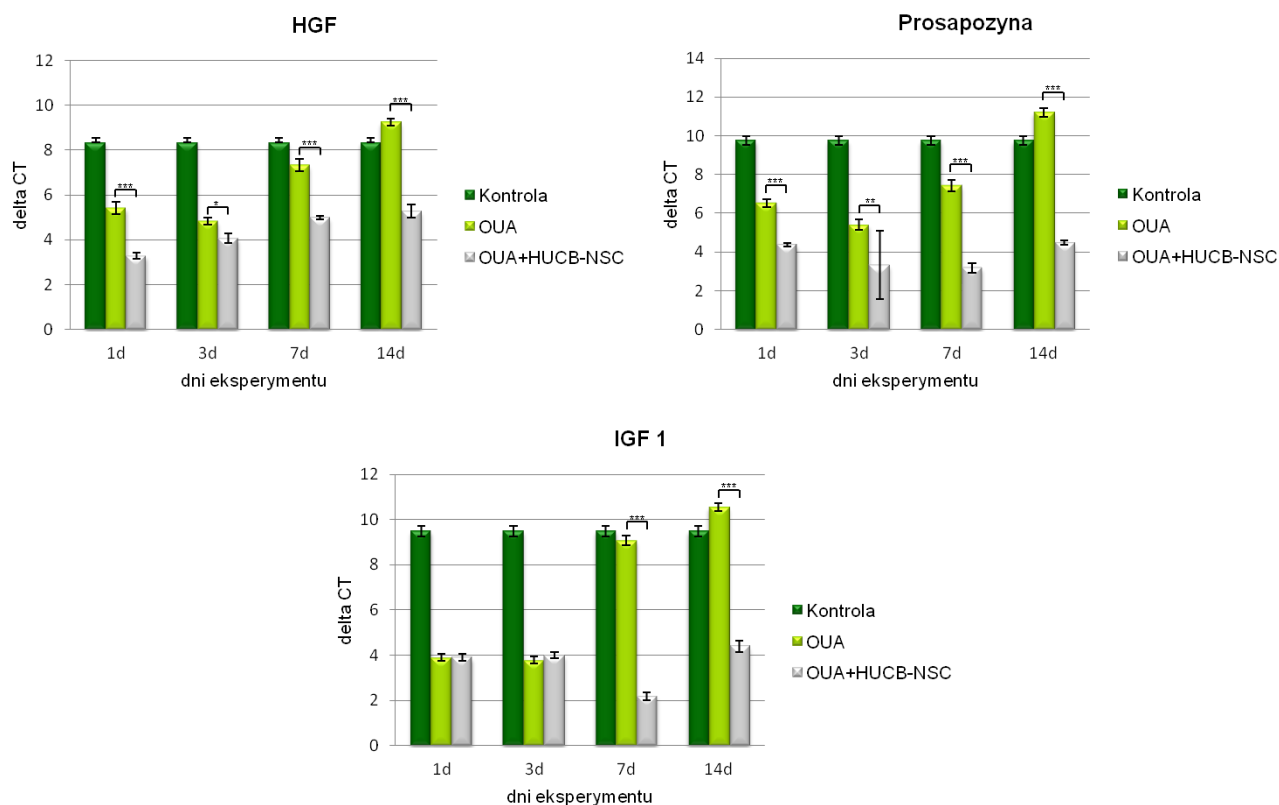
### 5.12.1. Analiza endogennych czynników neurotroficznych w mózgu szczurów po uszkodzeniu mózgu ouabainą i transplantacji HUCB-NSC

Analiza RT-PCR wybranych przez nas endogennych (produkowanych przez komórki szczura) czynników troficznych wykazała ekspresję BDNF, GDNF, CNTF, NT3, HGF, EGF, IGF1, semaforiny i presapozyny w mózgu szczura. Obecność mRNA tych czynników, stwierdzono w materiale badawczym izolowanym z mózgow zwierząt po uszkodzeniu prążkowiego i u szczurów, którym po wcześniejszym podaniu ouabainy przeszczepiano ludzkie progenitory neuralne. Podobnie obecność mRNA tych czynników obserwowano u szczurów kontrolnych, niepoddanych zabiegom operacyjnym (Tabela 5).

Tabela 5. Ekspresja mRNA endogennych czynników troficznych w mózgu szczurów po uszkodzeniu prążkowiec OUA i transplantacji komórek HUCB-NSC (RT-PCR)

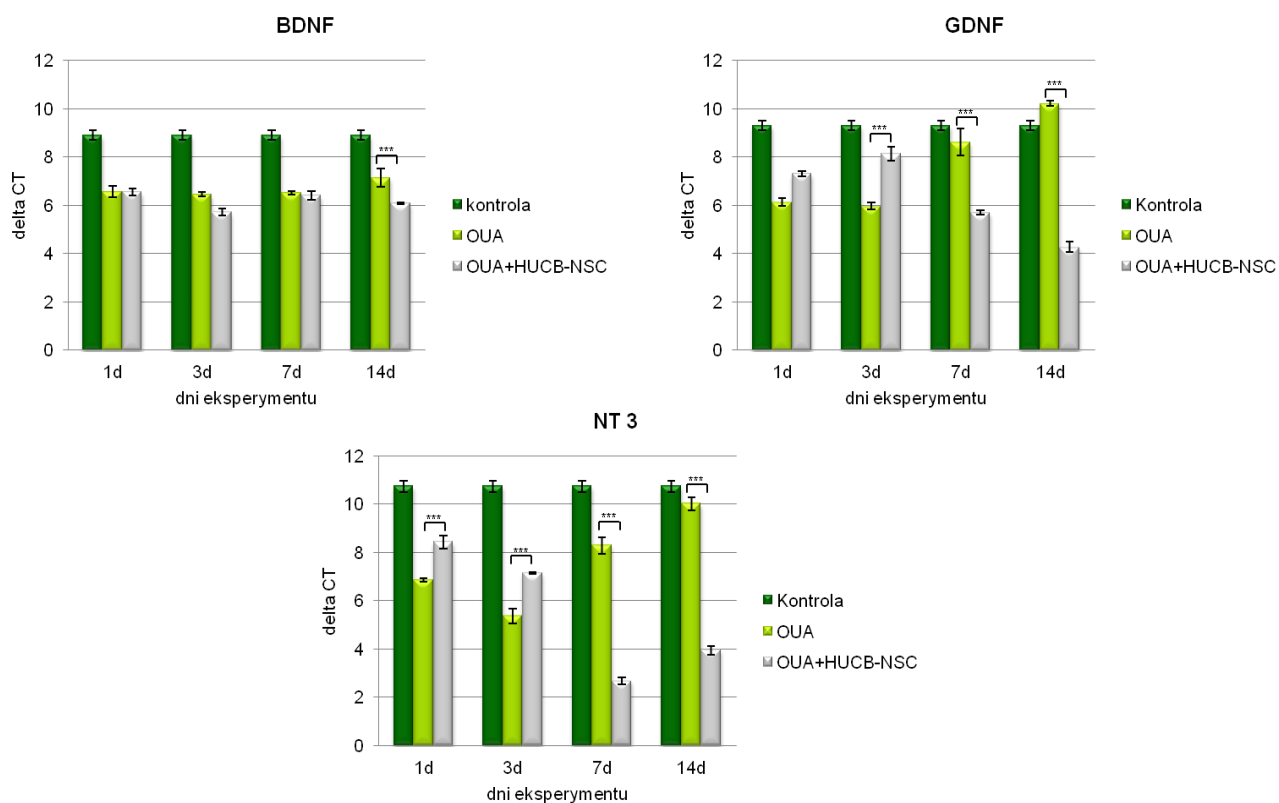
	Kontrola	1 dzień		3 dzień		7 dzień		14 dzień	
		OUA	OUA + HUCB-NSC	OUA	OUA + HUCB-NSC	OUA	OUA + HUCB-NSC	OUA	OUA + HUCB-NSC
BDNF	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+/-
GDNF	+	+	+	+	+	+	+	-	+/-
CNTF	-	-	-	-	-	+	+	-	+/-
NT3	+/-	+	+	+	+	+/-	+	-	+/-
EGF	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
HGF	+/-	+	+	+	+	+	+	-	+
IGF-1	+/-	+	+	+	+	+/-	+	-	+
Semaforyna	+/-	+	+	+	+	+/-	+	-	+/-
Prosapozyna	+/-	+	+	+	+	+	+	+/-	+
GAPDH	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Zastosowanie metody PCR w czasie rzeczywistym umożliwiło zbadanie poziomu ekspresji czynników neurotroficznych obecnych w mózgu szczurów po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą i w grupie zwierząt po ischemii i przeszczepie HUCB-NSC. Wyniki naszych badań wykazały wzrost poziomu ekspresji endogennych czynników troficznych w mózgu szczurów po uszkodzeniu prążkowiec i u zwierząt, którym po podaniu ouabainy przeszczepiono HUCB-NSC, w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi. Po transplantacji HUCB-NSC obserwowano statystycznie istotny wzrost ekspresji mRNA czynników odpowiedzialnych za działanie neuroprotektoryjne i antyapoptotyczne (HGF, prosapozyna, IGF-1) w porównaniu do poziomu ekspresji tych czynników w mózgu zwierząt bez przeszczepu. W przypadku HGF i prosapozyny zmiany te były widoczne już pierwszego dnia po podaniu ludzkich progenitorów neuralnych i utrzymywały się przez cały czas obserwacji. Różnice w ekspresji mRNA IGF-1 w mózgu szczurów po uszkodzeniu ouabainą i transplantacji HUCB-NSC w stosunku do zwierząt, które nie otrzymywały przeszczepu pojawiały się w siódmym dniu po transplantacji komórek. Były również obserwowane w 14-ym dniu trwania eksperymentu (ryc.42).



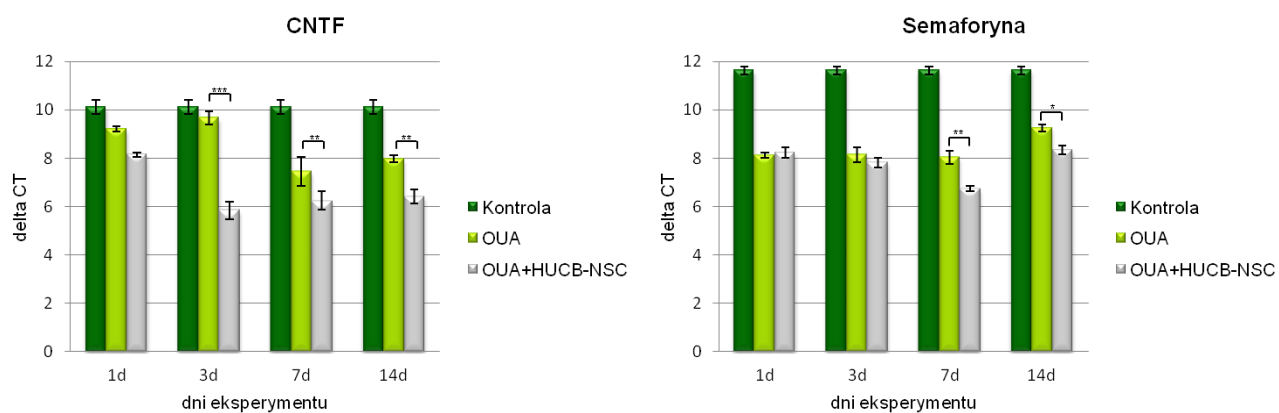
Ryc.42. Analiza ekspresji mRNA, wybranych endogennych czynników troficznych (HGF, prosapozyna, IGF-1) w mózgu szczurów, w poszczególnych grupach eksperymentalnych, oceniana metodą Real Time PCR, w sekwencji czasowej dwóch tygodni. Wyniki badań przedstawione jako wartości delta CT, czyli różnice ekspresji badanego genu w stosunku do genu referencyjnego GAPDH. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie  $\pm$ SE, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Kolejną grupę badanych endogennych czynników neurotroficznych stanowiły: BDNF, GDNF i NT3, promujące proliferację i przeżycie dojrzałych komórek neuralnych. Obserwowano wzrost poziomu ekspresji mRNA tych czynników w mózgu szczurów po podaniu ouabainy i u zwierząt z uszkodzeniem prążkowiec, którym przeszczepiono HUCB-NSC, w stosunku do zwierząt kontrolnych. Po transplantacji HUCB-NSC statystycznie istotny wzrost ekspresji mRNA NT3 był widoczny przez cały czas obserwacji, w przypadku GDNF - po 7 dniach, a BDNF 14-ego dnia po podaniu komórek, w porównaniu do poziomu ekspresji tych czynników w mózgu zwierząt bez przeszczepu (ryc.43).



Ryc.43. Analiza ekspresji mRNA, wybranych endogennych czynników troficznych (BDNF, GDNF, NT3) w mózgu szczurów w poszczególnych grupach eksperymentalnych oceniana metodą Real Time PCR w sekwencji czasowej dwóch tygodni. Wyniki badań przedstawione jako wartości delta CT, czyli różnice ekspresji badanego genu w stosunku do genu referencyjnego GAPDH. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie  $\pm$ SE, \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ .

Do czynników odpowiedzialnych za różnicowanie funkcjonalne komórek neuralnych należą m.in. CNTF i semaforyna. Poziom ekspresji mRNA tych czynników endogennych w mózgu szczurów po uszkodzeniu prążkowiec i zwierząt, którym po podaniu ouabainy przeszczepiono komórki ludzkie, był wyższy w porównaniu z grupą kontrolną. Po transplantacji HUCB-NSC obserwowano statystycznie istotny wzrost ekspresji mRNA CNTF 3-ego dnia, a w przypadku semaforyny 7-go dnia obserwacji w porównaniu do poziomu ekspresji tych czynników w mózgu zwierząt bez przeszczepu komórek (ryc.44).



Ryc.44. Analiza ekspresji wybranych endogennych czynników troficznych (CNTF, semaforyna) w mózgu szczurów w poszczególnych grupach eksperymentalnych oceniana metodą Real Time PCR w sekwencji czasowej dwóch tygodni. Wyniki badań przedstawione jako wartości delta CT, czyli różnice ekspresji badanego genu w stosunku do genu referencyjnego GAPDH. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie  $\pm$ SE, \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ .

### 5.12.2. Analiza egzogennych czynników neurotroficznych pochodzenia ludzkiego w mózgu szczurów po uszkodzeniu mózgu ouabainą i transplantacji HUCB-NSC

Analiza RT-PCR wybranych egzogennych (produkowanych przez komórki ludzkie) czynników troficznych wykazała ekspresję BDNF, GDNF, CNTF, NT3, HGF, EGF, semaforyny i prosapozyny w mózgu szczurów, którym po wcześniejszym podaniu ouabainy przeszczepiano ludzkie progenitory neuralne. Doświadczenia przeprowadzone u biorców HUCB-NSC z użyciem zestawu starterów charakterystycznych dla czynników troficznych pochodzenia ludzkiego uwidoczniły mRNA tych czynników w mózgu szczurów w pierwszym dniu po przeszczepie. Obecność czynników egzogennych stwierdzono do siódmego dnia trwania eksperymentu (Tabela 6).

Tabela 6. Ekspresja mRNA egzogennych czynników troficznych w mózgu szczurów po uszkodzeniu prążkowiec OUA i transplantacji komórek HUCB-NSC (RT-PCR)

	Kontrola	1 dzień		3 dzień		7 dzień		14 dzień	
		OUA	OUA + HUCB-NSC	OUA	OUA + HUCB-NSC	OUA	OUA + HUCB-NSC	OUA	OUA + HUCB-NSC
BDNF	-	-	+	-	+	-	+/-	-	-
GDNF	-	-	+/-	-	+	-	+	-	+/-
CNTF	-	-	+	-	+	-	+/-	-	-
NT3	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-
EGF	-	-	+	-	+	-	+/-	-	-
HGF	-	-	+	-	+	-	+	-	-
IGF-1	-	-	+	-	+	-	+/-	-	+/-
Semaforyna	-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	-
Prosapozyna	-	-	+/-	-	+	-	+	-	-
GAPDH	-	-	+	-	+	-	+	-	-

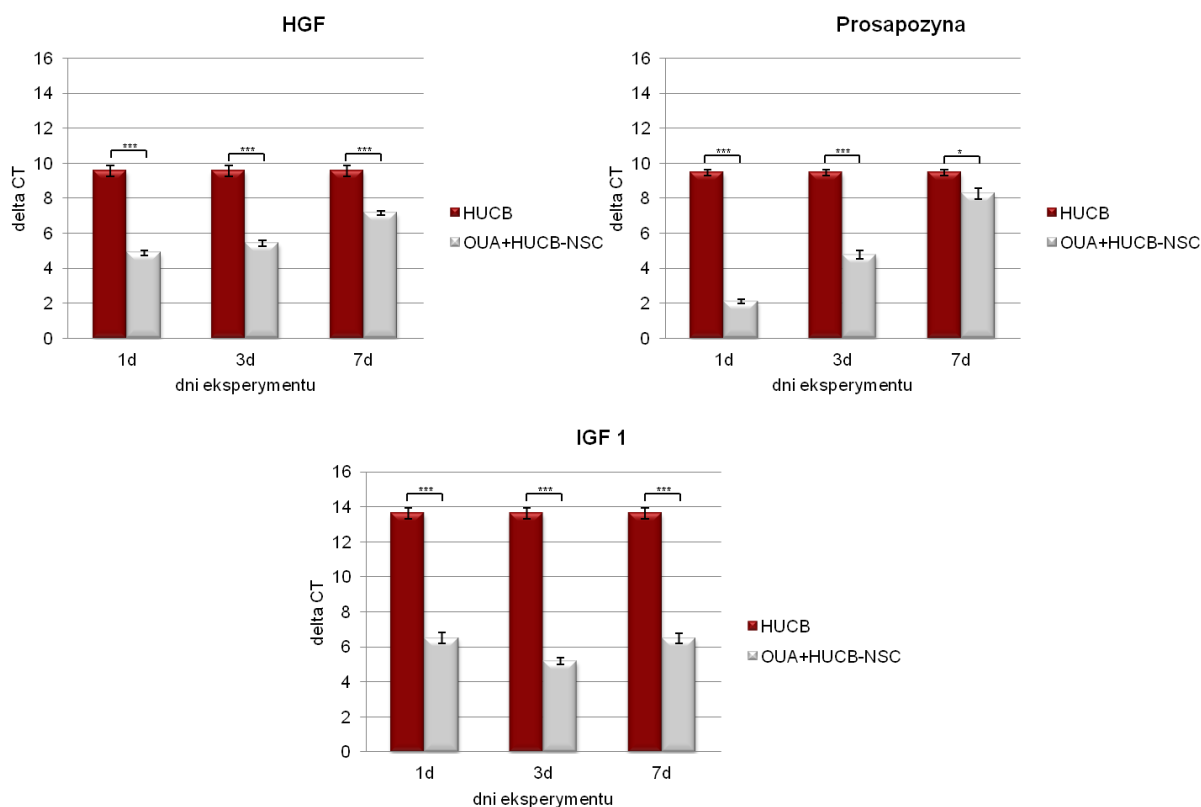
Po 14 dniach od momentu transplantacji HUCB-NSC nie wykrywano ekspresji mRNA żadnego z badanych czynników w tym także ludzkiego genu referencyjnego, co świadczy o braku żywych komórek dawcy (ryc.45.)



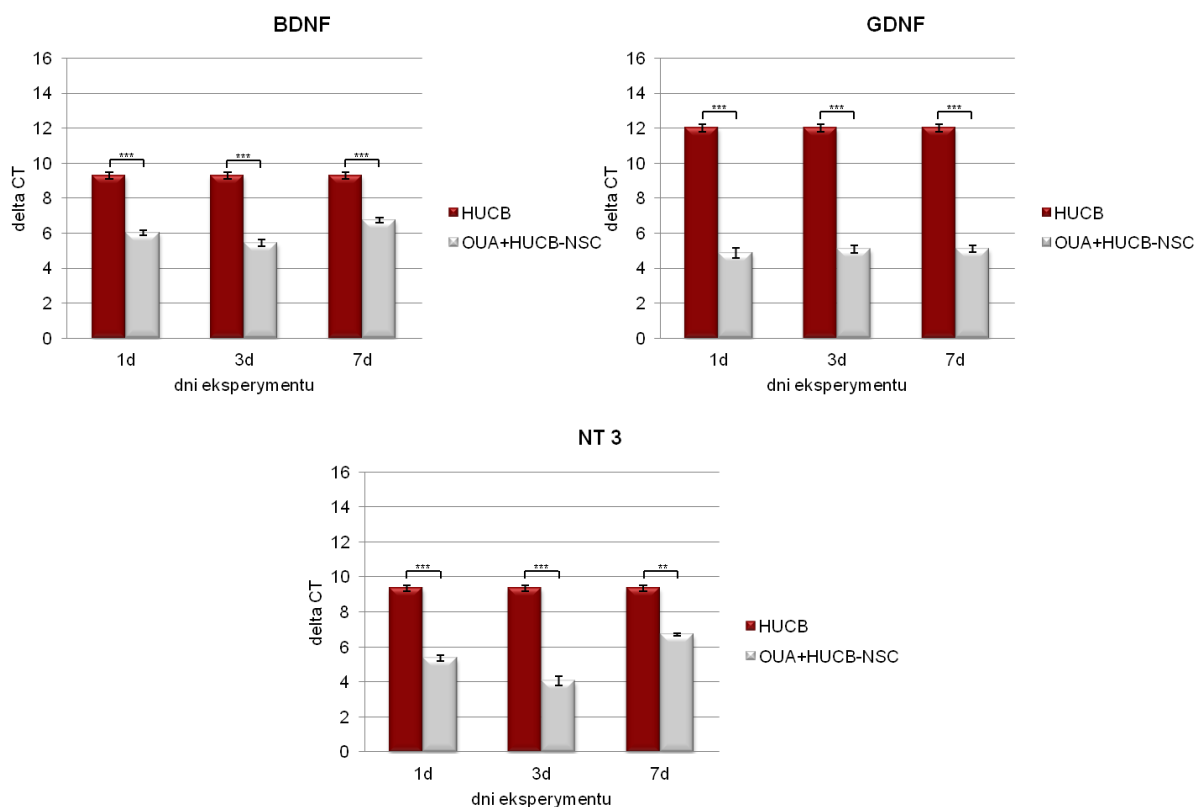
Ryc.45. Ekspresja ludzkiego genu referencyjnego GAPDH w mózgu zwierząt z wywołanym uszkodzeniem mózgu w poszczególnych dniach eksperymentu

Badania z zastosowaniem metody PCR w czasie rzeczywistym ujawniły zróżnicowany poziom ekspresji mRNA egzogennych czynników troficznych w mózgu zwierząt poddanych uszkodzeniu prążkowiec, którym przeszczepiono HUCB-NSC. Ekspresja czynników troficznych pochodzenia ludzkiego w mózgu szczurów-biorców przeszczepu była porównana z ekspresją tych czynników, jaką wykazywały HUCB-NSC w standardowej hodowli. U zwierząt eksperymentalnych po uszkodzeniu mózgu i transplantacji ludzkich progenitorów neuralnych

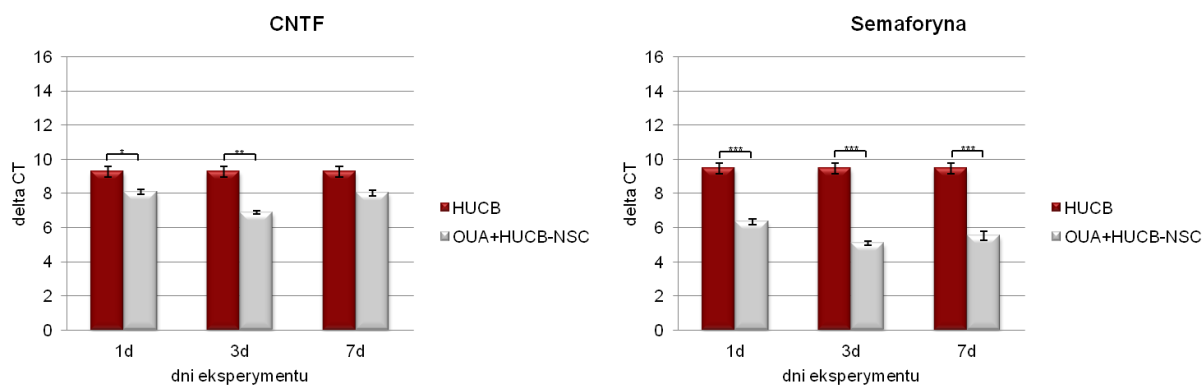
obserwowano statystycznie istotny wyższy poziom ekspresji mRNA wszystkich badanych czynników egzogennych w porównaniu do poziomu ich ekspresji w HUCB-NSC hodowanych *in vitro*. Obecność w mózgu szczurów mRNA HGF, IGF-1, presapozyny, BDNF, GDNF, NT3, CNTF i semaforyny pochodzenia ludzkiego stwierdzono 24 godz. po przeszczepie HUCB-NSC. Poziom ekspresji badanych czynników był widoczny do 7-ego dnia obserwacji (ryc.46; 47; 48).



Ryc.46. Analiza Real Time PCR ekspresji wybranych egzogennych (ludzkich) czynników troficznych (HGF, presapozyna, IGF-1) w mózgu szczurów poddanych uszkodzeniu prążkowiec OUA, biorców przeszczepu HUCB-NSC w porównaniu z ekspresją mRNA tych czynników w komórkach HUCB-NSC hodowanych *in vitro*. Wyniki badań przedstawione jako wartości delta CT, czyli różnice ekspresji badanego genu w stosunku do genu referencyjnego GAPDH. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie  $\pm$ SE, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .



Ryc.47. Analiza Real Time PCR ekspresji wybranych egzogennych (ludzkich) czynników troficznych (BDNF, GDNF, NT3) w mózgu szczurów poddanych uszkodzeniu prądkowia OUA biorców przeszczepu HUCB-NSC w porównaniu do ekspresji mRNA tych czynników w komórkach HUCB-NSC hodowanych *in vitro*. Wyniki badań przedstawione jako wartości delta CT, czyli różnice ekspresji badanego genu w stosunku do genu referencyjnego GAPDH. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie  $\pm$ SE, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .



Ryc.48. Analiza Real Time PCR ekspresji wybranych egzogennych (ludzkich) czynników troficznych (CNTF, semaforyna) w mózgu szczurów poddanych uszkodzeniu prądkowia OUA biorców przeszczepu HUCB-NSC w porównaniu do ekspresji mRNA tych czynników w komórkach HUCB-NSC hodowanych *in vitro*. Wyniki badań przedstawione jako wartości delta CT, czyli różnice ekspresji badanego genu w stosunku do genu referencyjnego GAPDH. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie  $\pm$ SE, \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .



## 6. DYSKUSJA WYNIKÓW

Odkrycie w mózgu dorosłych osobników gryzoni i człowieka neuralnych komórek macierzystych zrewolucjonizowało dotychczas istniejący pogląd, iż zniszczone struktury OUN nie podlegają regeneracji. Ponadto wyniki badań ostatnich lat wykazały, iż w stanach patologicznych związanych z uszkodzeniem OUN dochodzi do wzrostu proliferacji komórek macierzystych w strefach neurogennych i migracji progenitorów do miejsc uszkodzenia, gdzie różnicują się w dojrzałe neurony (Cova i wsp., 2004; Munoz i wsp., 2005; Jin i wsp., 2006; Ekdahl i wsp., 2003). Jednak repopulacja zniszczonych komórek nerwowych przez endogenne progenitory neuralne jest niedostateczna, stąd koncepcja zastosowania komórek macierzystych wydaje się być wielką nadzieją w leczeniu chorób neurologicznych zarówno tych o charakterze neurodegeneracyjnym jak i uszkodzeń OUN powstałych w wyniku udaru mózgu czy urazu rdzenia kręgowego.

Pomimo bardzo obiecujących wyników doświadczeń *in vitro* wskazujących na ogromny potencjał proliferacji i wielokierunkowość różnicowania embrionalnych komórek macierzystych (Kelly i wsp., 2004; Hayashi i wsp., 2006), badania *in vivo* ujawniły ich zdolność do tworzenia nowotworów (Erdo i wsp., 2003; Swijnenburg i wsp., 2008). Wyniki te oraz kontrowersje etyczno-prawne wokół embrionalnych komórek macierzystych spowodowały, że zaczęto poszukiwać alternatywnych źródeł somatycznych komórek macierzystych. W ciągu kilkunastu ostatnich lat odkryto metody pozyskiwania komórek macierzystych z różnych źródeł, w tym z tkanek płodu oraz metody ukierunkowywania tych komórek w progenitory neuralne (Buzanska i wsp., 2002; Walczak i wsp., 2004; Buzanska i wsp., 2006; Sun i wsp., 2005; Haas i wsp., 2005; Habich i wsp., 2006; De Coppi i wsp., 2007; Kim i wsp., 2007; Metcalfe i wsp., 2008; Ali i wsp., 2009). Szczególnie cennym źródłem komórek macierzystych okazała się krew pępowinowa. Progenitory izolowane z krwi pępowinowej w porównaniu do komórek szpiku są mniej dojrzałe, wykazują większy potencjał proliferacyjny i dłuższy czas przeżycia w warunkach *in vitro*, są łatwiej dostępne i nie stwarzają ryzyka transmisji patogenów po przeszczepie (Kogler i wsp., 2004; Lidvall i Kokaia, 2004). Mimo, iż dotychczasowe wyniki badań eksperymentalnych przeprowadzonych w naszym laboratorium z udziałem komórek macierzystych z krwi pępowinowej *in vitro* są bardzo obiecujące (Buzanska i wsp., 2006; Jurga i wsp., 2006; Sypecka i wsp., 2008; Jurga i wsp., 2009; Buzanska i wsp., 2009; Markiewicz i wsp., 2011; Jurga i wsp., 2011; Janowski i wsp., 2011; Zychowicz i wsp., 2012) to jednak zastosowanie tych komórek w klinice wymaga badań przedklinicznych w celu opracowania standardów transplantacyjnych, a także poznania mechanizmów za pośrednictwem, których biorą one udział w naprawie uszkodzonej tkanki mózgu. Wykorzystanie komórek macierzystych w leczeniu udaru mózgu jest jedną z szeroko dyskutowanych i badanych kwestii w dzisiejszym świecie naukowym. Jednak mimo tak szerokiego zainteresowania wiele pytań nadal pozostaje bez odpowiedzi. Podstawową niewiadomą jest mechanizm działania przeszczepionych komórek *in vivo*.

W moich badaniach starałam się prześledzić los neuralnych komórek macierzystych wyizolowanych z ludzkiej krwi pępowinowej przeszczepionych do mózgu szczura po uszkodzeniu prądkowia ouabainą oraz poznać mechanizmy działania tych komórek jak i odpowiedź biorcy na przeszczep. Przedmiot badań stanowiła nietransformowana linia neuralnych komórek macierzystych ludzkiej krwi pępowinowej (HUCB-NSC) otrzymana w naszym laboratorium (Buzanska i wsp., 2006). Dostępność jednorodnego materiału, jaki stanowi stabilna linia HUCB-NSC, pozwoliła na stworzenie powtarzalnych układów

doświadczalnych. Do przeprowadzenia eksperymentów wykorzystano model cytotoksycznego uszkodzenia mózgu ouabainą opracowany w naszym zespole (Janowski i wsp., 2008). Model ten odpowiada patofizjologicznym i morfologicznym zmianom zachodzącym w udarze struktur głębokich mózgu u ludzi (van der Stert i wsp., 2001; Veldhuis i wsp., 2003a; Veldhuis i wsp., 2003b).

### 6.1. Charakterystyka ludzkich komórek macierzystych po ich transplantacji do mózgu szczura

Wstępne eksperymentalne próby transplantacji ludzkich komórek krwi pępowinowej u szczurów po ischemii przyniosły obiecujące wyniki. Autorzy tych badań wykazali obecność podanych dożylnie komórek dawcy w mózgu w pobliżu uszkodzenia, ich różnicowanie w neurony oraz integrację przeszczepionych komórek z tkanką gospodarza (Chen i wsp., 2001, Willing i wsp., 2003). Wyniki naszych doświadczeń z użyciem komórek linii HUCB-NSC nie potwierdziły tych doniesień. Przeszczepione do mózgu dorosłego szczura ludzkie komórki krwi pępowinowej przeżywały jedynie okres do 2 tygodni po transplantacji. Taki czas przeżycia obserwowany był zarówno w mózgu zdrowych szczurów jak i u zwierząt z wywołanym wcześniej uszkodzeniem mózgu ouabainą. Podane do istoty białej HUCB-NSC pozostawały przez kilka dni w miejscu wszczepu, wykazując nieznaczny stopień proliferacji. Wyniki naszych badań były zgodne z wcześniejszymi spostrzeżeniami innych autorów, którzy opisali niski procent proliferujących komórek ludzkiej krwi pępowinowej przeszczepionych do mózgu gryzoni (Coenen i wsp., 2005; Nystedt i wsp., 2006; De Paula i wsp., 2009). Podobny stopień proliferacji obserwowany był przez inne grupy badawcze po przeszczepie embrionalnych komórek macierzystych lub progenitorów neuralnych izolowanych od dorosłych osobników do mózgu szczura w układzie ksenogenicznym (Le Belle i wsp., 2004; Olstorn i wsp., 2007). W naszych badaniach, po 7 dniach od momentu transplantacji, obserwowano wyraźną migrację ludzkich komórek wzdłuż włókien istoty białej w kierunku uszkodzenia, co było zgodne z innymi doniesieniami literaturowymi (Wong i wsp., 2005). Migracja przeszczepionych komórek do miejsca lezji jest prawdopodobnie spowodowana wzrostem aktywności chemokin w tym rejonie. Jiang i wsp. (2008) opisali zwiększony poziom ekspresji MCP-1 i MIP-1 $\alpha$  w półkuli mózgu szczura tożsamej z uszkodzeniem i wzrost migracji przeszczepionych komórek krwi pępowinowej w porównaniu z półkulą kontrlateralną (Jiang Li i wsp., 2008). W badaniach *in vitro* potwierdzono obecność receptorów dla chemokin na powierzchni komórek ludzkiej krwi pępowinowej (Park i wsp., 2009). Zastosowanie poliklonalnych przeciwciał przeciw MCP-1 i MIP-1 $\alpha$  ograniczało migrację komórek. Te wyniki sugerują, że chemokiny są atraktantami dla przeszczepionych komórek krwi odpowiedzialnymi za ukierunkowaną migrację tych komórek i ich gromadzenie w okolicy lezji. W rejonach zdrowej tkanki nie obserwowano komórek dawcy. Podobne wyniki otrzymali inni autorzy, przeszczepiając ludzkie neuralne komórki macierzyste do mózgu szczura po uszkodzeniu (Wennersten i wsp., 2004; Olstorn i wsp., 2007).

Wcześniejsze nasze badania potwierdziły zdolność HUCB-NSC do różnicowania *in vitro* w neurony, astrocyty i oligodendrocyty (Jurga i wsp., 2006). Jednak w eksperymentach przeprowadzonych *in vivo*, przeszczepione do mózgu szczura ludzkie progenitory krwi pępowinowej nie wykazywały ekspresji antygenów typowych dla dojrzałych komórek neuralnych. Wśród komórek dawcy obecnych w mózgu szczura 7 dni po transplantacji jedynie pojedyncze z nich wykazywały obecność białek NF-200, charakterystycznych dla młodych neuronów. Brak zróżnicowanych fenotypów neuralnych lub niewielki procent komórek pozytywnych pod względem ekspresji antygenów typowych dla dojrzałych neuronów opisano także w pracach innych grup badawczych, gdzie przeszczepiano ludzkie komórki krwi

pępowinowej do mózgu dorosłych szczurów (Kuh i wsp., 2005, Liu i wsp., 2006, Hicks i wsp., 2007, Kozłowska i wsp., 2007). Przyczyną tego może być krótki czas obserwacji z uwagi na szybką eliminację ksenogenicznych komórek z mózgu szczurów – biorców przeszczepu. Z badań Kelly i wsp. (2004), wynika, że czas potrzebny *in vivo* do zróżnicowania ludzkich progenitorów neuralnych w funkcjonalne neurony wynosi kilka miesięcy (Kelly i wsp., 2004).

Ograniczone przeżycie ludzkich neuralnych komórek macierzystych izolowanych z krwi pępowinowej w mózgu szczura po ich transplantacji może być związane z reakcją immunologiczną gospodarza, stąd drugi etap moich badań dotyczył szczegółowej analizy parametrów immunologicznych stanowiących odpowiedź biorcy na przeszczep HUCB-NSC.

## 6.2. Odpowiedź immunologiczna w mózgu szczura po przeszczepie ludzkich komórek

Jeszcze do niedawna istniał pogląd, wprowadzony przez Billingham'a i Boswell'a, że mózg jest miejscem uprzywilejowanym immunologicznie, umożliwiającym przedłużenie przeżycia przeszczepu (Billingham i Boswell 1953). Obecnie wiadomo, że reakcje immunologiczne w OUN są porównywalne z obserwowanymi w innych narządach. Przeszczep komórek do mózgu dorosłych szczurów powoduje pobudzenie efektorów zarówno wrodzonej (nieswoistej) jak i adaptacyjnej (swoistej) odpowiedzi immunologicznej biorcy. Wielkość odpowiedzi immunologicznej zależy od relacji genetycznych pomiędzy dawcą i biorcą. Akceptacja lub odrzucenie przeszczepu jest uwarunkowane rodzajem antygenów dawcy i stanem immunologicznym biorcy. Wyniki badań prowadzonych w wielu laboratoriach wykazały, że pierwszą linię obrony gospodarza w przypadku transplantacji komórek ksenogenicznych stanowią mechanizmy immunologiczne odpowiedzi wrodzonej. W ośrodkowym układzie nerwowym efektorami nieswoistej odpowiedzi immunologicznej są komórki mikrogleju i astrocyty (Finsen i wsp., 1991; Wood i wsp., 1996; Remy i wsp., 2001; Larsson i wsp., 2001; Michel i wsp., 2006;), a także białka dopełniacza i naturalne przeciwciała klasy IgM (Gasque i wsp., 2000; Lucin i wsp., 2009).

W naszych badaniach po przeszczepie HUCB-NSC do mózgu szczura po uszkodzeniu prążkowiec oabainą widoczna była aktywacja mikrogleju i astrocytów już po 24 godz. od podania komórek. Podczas kilkudniowej obserwacji zanotowano wzrost komórek ED1<sup>+</sup> i GFAP<sup>+</sup>, zarówno w rejonie uszkodzenia jak i w okolicy wszczepu komórek ludzkich. W mózgu widoczne były także pojedyncze neutrofile. Podobne wyniki otrzymali autorzy przeszczepiając komórki krwi pępowinowej szczurom w eksperymentalnym modelu udaru fotochemicznego kory mózgowej (Kozłowska i wsp. 2007). Zwiększoną reaktywność mikrogleju i astrocytów stwierdzono także po przeszczepie do mózgu dorosłych gryzoni ludzkich komórek izolowanych z innych niż krew pępowinowa tkanek (Walczak P i wsp., 2004; Olstorn i wsp., 2007; Chen i Palmer., 2008). W przypadku transplantacji komórek szpiku myszy do mózgu dorosłych szczurów obserwowano mniejszą odpowiedź mikrogleju, dłuższe przeżycie komórek, większą zdolność migracji i różnicowania niż po przeszczepie komórek ludzkich (Walczak i wsp., 2004). Wydaje się, że komórki przeszczepiane w układzie ksenogenicznym o mniejszych różnicach filogenetycznych pomiędzy dawcą i biorcą, mogą być bardziej akceptowane. Jednak w badaniach innych autorów embrionalne komórki macierzyste myszy, do niedawna uznawane za nie immunogenne, powodowały odpowiedź immunologiczną biorcy po ich przeszczepieniu do mózgu dorosłych szczurów. Eliminacji tych komórek towarzyszyła aktywacja mikrogleju i astroglioza (Molcani i wsp., 2007). Dłuższe przeżycie przeszczepów ksenogenicznych stwierdzono u nowonarodzonych biorców z niewykształconym jeszcze układem immunologicznym. Po transplantacji ludzkich komórek krwi pępowinowej do mózgu oseków

szczura obserwowano żywe komórki dawcy po 4 tygodniach od momentu ich podania, efektywną migrację komórek w tkance i różnicowanie w dojrzałe neurony (Zigova i wsp., 2002; Kozłowska i wsp., 2005).

Pobudzenie nieswoistych mechanizmów odpowiedzi immunologicznej obserwowane było także po przeszczepieniu komórek allogenicznych, syngenicznych czy autologicznych do OUN (Tambuyzer i wsp., 2009; Bergwerf i wsp., 2009, Glover i wsp., 2010). Po transplantacji allogenicznych neuralnych lub mezenchymalnych komórek macierzystych do mózgu szczura, widoczna była silna aktywacja komórek mikrogleju i astrocytów. Jednocześnie w miejscu podania komórek stwierdzono wzrost ilości IL-1 $\beta$  i TNF- $\alpha$ . Reakcja komórek odpowiedzi nieswoistej była prawdopodobnie odpowiedzialna za ograniczenie liczby żywych komórek, upośledzenie migracji i w efekcie eliminację komórek dawcy (Mirza i wsp., 2004; Tambuyzer i wsp., 2009). W przypadku przeszczepów komórek syngenicznych lub autologicznych do OUN, poziom aktywacji efektorów odpowiedzi wrodzonej biorców jest mniejszy, ale widoczny. Transplantacja komórek mezenchymalnych szpiku kostnego szczura do hipokampa lub prążkowiec biorcy, tego samego co dawca przeszczepu, powodowała aktywację mikrogleju, napływ neutrofilii i astroglizję. Po 2 tygodniach brak było żywych komórek dawcy a w miejscu wszczepu widoczna była blizna (Coyne i wsp., 2006). Podobnie przeszczepieniu autologicznych neuralnych komórek macierzystych izolowanych ze strefy SVZ lewej półkuli do strefy SVZ półkuli prawej tego samego szczura towarzyszyła reakcja ze strony komórek mikrogleju i astrocytów, choć komórki pozostawały żywe i nie były eliminowane (Muraoka i wsp., 2006).

W procesie eliminacji komórek przeszczepianych do OUN biorą udział także efekторы odpowiedzi swoistej, limfocyty T i B (Barker i wsp., 2000). Brak naczyń limfatycznych w mózgu nie zapobiega przedostawaniu się antygenów do szyjnych węzłów chłonnych. Funkcje naczyń limfatycznych pełnią przestrzenie dookoła dużych naczyń krwionośnych mózgu, które ułatwiają drenaż antygeny z przeszczepionych komórek dawcy w OUN do węzłów szyjnych, gdzie następuje wychwytywanie antygeny przez limfocyty B i komórki dendrytyczne. W wyniku stymulacji limfocytów B powstają komórki plazmatyczne, które produkują immunoglobuliny. Prezentacja antygenów dawcy przez komórki dendrytyczne biorcy limfocytom T powoduje aktywację limfocytów CD4 i CD8 w węzłach chłonnych szyjnych i ich transfer do mózgu. Wprawdzie istniejąca bariera krew-mózg nie pozwala na przedostanie się spoczynkowych limfocytów i immunoglobulin do OUN, ale przez barierę mogą przechodzić aktywowane komórki immunologicznie czynne (Carrithers i wsp., 2000; Galea i wsp., 2007). Przerwanie bariery krew-mózg inicjuje swobodny transfer nie tylko aktywowanych komórek immunologicznie czynnych, ale także innych elementów morfotycznych krwi, które ulegają aktywacji w ognisku uszkodzenia i uwalniają dodatkowe czynniki prozapalne, stymulując procesy odpowiedzi immunologicznej w mózgu (Taupin i wsp., 2008). Aktywacja komórek mikrogleju i astrocytów w wyniku uszkodzenia mózgu powoduje produkcję cytokin prozapalnych, chemokin oraz innych czynników, które negatywnie wpływają na integralność bariery krew-mózg (Bilbo i wsp., 2009). Ponadto, uraz chirurgiczny towarzyszący transplantacji komórek do mózgu powoduje, iż bariera staje się przepuszczalna dla mikrocząstek i leukocytów krwi (Brundin i wsp., 1989).

Udział limfocytów biorcy w reakcji odrzucania przeszczepów neuralnych komórek macierzystych wydaje się być bardzo istotny. Świadczy o tym fakt przedłużenia przeżycia przeszczepów allogenicznych i ksenogenicznych u myszy transgenicznych z defektem immunologicznym (NOD/SCID, *non-obese diabetic severe combined immunodeficient*) pozbawionych komórek T, B i NK oraz zdolności stymulacji białek dopełniacza. Neuralne komórki macierzyste ludzkiej krwi pępowinowej przeszczepione do prążkowiec myszy NOD/SCID przeżywają w mózgu 4 tygodnie różnicując się w dojrzałe komórki nerwowe, które wbudowują się w sieć neuronów gospodarza (Walczak P i wsp., 2007). Podobny efekt przedłużenia

przeżycia ksenogenicznego przeszczepu komórek neuralnych, był obserwowany u szczurów nagich (*nude rats*) (Hurelbrink i wsp., 2002) lub dzikich z deplecją limfocytów T, po podaniu specyficznych przeciwciał (Okura i wsp., 1997).

W przeszczepach ksenogenicznych u zwierząt immunokompetentnych mechanizmy odpowiedzi adaptacyjnej mają niewielkie znaczenie, ale aktywacja limfocytów wzmacnia reakcję komórek odpowiedzi wrodzonej, inicjując odrzucenie przeszczepu. W naszych badaniach, po przeszczepieniu HUCB-NSC do mózgu szczura, obserwowaliśmy obecność limfocytów T i limfocytów B, które gromadziły się w okolicach wszczepu komórek dawcy już po 24 godz. od momentu transplantacji. Liczba komórek CD5<sup>+</sup> i CD45<sup>+</sup> nie zmieniała się podczas czasu trwania eksperymentu. Po 2 tygodniach obserwacji, pomimo iż w mózgu szczura widoczne były jedynie pojedyncze HUCB-NSC, limfocyty T i B były obecne w miejscu tworzenia się blizny glejowej. Pojawienie się limfocytów T w mózgu szczurów po przeszczepie ludzkich komórek zostało opisane przez innych autorów (Walczak i wsp., 2004; Olstorn i wsp., 2007; Chen i Palmer 2008). W przeszczepach komórek ksenogenicznych do OUN obserwuje się obecność limfocytów T już w pierwszych godzinach po transplantacji (Larsson i wsp., 2000). Z badań Wood i wsp. (1996) wynika, że w eliminacji ksenogenicznych komórek, po ich podaniu do OUN, biorą udział głównie limfocyty T regulatorowe (CD4<sup>+</sup>). Deplecja limfocytów T-CD4<sup>+</sup> powodowała dłuższe przeżycie komórek izolowanych ze śródmózgowia ludzkich płodów przeszczepionych do mózgu myszy. Podobny transfer komórek T-CD4<sup>+</sup> myszom pozbawionym limfocytów T przyspieszał odrzucenie przeszczepu neuralnych komórek płodów świni u dorosłych szczurów. Takich reakcji nie obserwowano w przypadku podania limfocytów cytotoksycznych/supresorowych (CD8<sup>+</sup>). Limfocyty T odgrywają główną rolę w odrzucaniu przeszczepów allogenicznych. Co ciekawe, podobnie jak w przypadku przeszczepów ksenogenicznych, obserwuje się różnice w działaniu limfocytów T-CD4<sup>+</sup> i limfocytów T-CD8<sup>+</sup>. Przeszczep komórek neuralnych szczura do mózgu allogenicznego biorcy powoduje gromadzenie się limfocytów T regulatorowych dookoła komórek dawcy natomiast migrację limfocytów T cytotoksycznych/supresorowych do wewnątrz wszczepu. Wzajemne oddziaływanie limfocytów T-CD4<sup>+</sup> i T-CD8<sup>+</sup> powoduje uwolnienie cytokin takich jak: IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , które zwiększają antygenowość komórek dawcy prowadząc do ich szybszej eliminacji (Muraoka i wsp., 2006).

Ujawnienie w naszych dotychczasowych badaniach aktywacji mechanizmów immunologicznych biorcy w reakcji na przeszczep ludzkich neuralnych komórek macierzystych krwi pępowinowej do mózgu szczura skłoniło nas do zastosowania w kolejnym etapie badań immunosupresji. Sugestie o konieczności stosowania leków immunosupresyjnych wykazały badania innych autorów, którzy przeszczepiali ludzkie komórki w modelu eksperymentalnym uszkodzenia rdzenia kręgowego u szczura (Hayashi i wsp., 2005; Ronsyn i wsp., 2007). Stosowanie leków immunosupresyjnych u biorców przeszczepów ma na celu ograniczenie reakcji immunologicznych. Klasycznym środkiem stosowanym w przeszczepach allogenicznych, ale także ksenogenicznych jest cyklosporyna A (CsA). Istota działania CsA polega na blokowaniu aktywacji limfocytów T. Specyficzne powinowactwo, jakie CsA wykazuje w stosunku do limfocytów regulatorowych TH1, powoduje zahamowanie ich proliferacji i produkcji cytokin takich jak IL-2, IFN- $\gamma$ , co w efekcie uniemożliwia aktywację limfocytów cytotoksycznych.

Analiza parametrów odpowiedzi immunologicznej w mózgu szczurów po uszkodzeniu ouabainą i przeszczepie HUCB-NSC wykazała w naszych badaniach pobudzenie komórek reakcji adaptacyjnej biorcy mimo stosowania CsA. Trzy dni po transplantacji komórek ludzkich, w okolicach wszczepu obserwowane były limfocyty T, których liczba wzrastała po 7 dniach. W sąsiedztwie przeszczepionych komórek dawcy stwierdzono obecność przeciwciał klasy IgM.

Immunoreaktywność IgM w mózgu szczura po transplantacji ludzkich komórek utrzymywała się przez 3 tygodnie. Nie wiadomo co jest źródłem obserwowanych IgM. Naturalne przeciwciała klasy IgM przeciwko ksenoantygenom są obecne w surowicy krwi. Ich napływ do mózgu może być spowodowany obecnością ludzkich komórek. Źródłem IgM mogą być także limfocyty B, które przedostają się z krwi do OUN, gdzie w obecności przeszczepu ulegają aktywacji, przekształcając się w komórki plazmatyczne, które produkują immunoglobuliny klasy M. Stąd swoiste reakcje immunohistochemiczne mogą identyfikować IgM powstałe w mózgu *de novo* w odpowiedzi na HUCB-NSC lub oznaczać IgM wcześniej obecne w łożysku naczyniowym krwi, które przedostały się do OUN. Wydaje się, że mechanizmy humoralne mogą być odpowiedzialne za szybkie odrzucenie ksenogenicznych komórek przeszczepianych do mózgu. Obecność IgM w mózgu szczura po transplantacji neuralnych komórek prekursorowych świni, szczególnie w miejscu o wyraźnych cechach odrzucenia przeszczepu, wykazał Armstrong i wsp. (2001). Wcześniejsze wyniki badań sugerują, że IgM biorą udział we wczesnej fazie odrzucania przeszczepu. Przeszczep komórek izolowanych ze śródmózgowia płodów świni do mózgu myszy pozbawionych immunoglobulin przeżywał 4 tygodnie dłużej w porównaniu do przeszczepu u zwierząt dzikich (Larsson i wsp., 1999). Podawanie CsA szczurom po przeszczepieniu HUCB-NSC w naszych badaniach nie ograniczało odpowiedzi nieswoistej. Ponadto aktywacja komórek mikrogleju i astrocytów po przeszczepie HUCB-NSC była porównywalna z reakcją widoczną u zwierząt bez stosowania CsA. Po 3 tygodniach w mózgu szczurów nie obserwowano żywych komórek dawcy.

Podobne wyniki badań uzyskali inni autorzy. Zastosowanie CsA nie spowodowało przedłużenia przeżycia ludzkich komórek przeszczepianych do mózgu szczura, nieznacznie zmieniając w niektórych eksperymentach obraz reakcji ze strony komórek odpowiedzi adaptacyjnej (Kogler G i wsp., 2004; Walczak i wsp., 2004; Pan i wsp., 2005; Janowski i wsp., 2006; Niranjani i wsp., 2007; Hicks i wsp., 2009). Walczak i wsp. (2007) zauważyli, że podanie CsA biorcom ksenoprzeszczepów powoduje zmniejszenie nacieku limfocytów T we wczesnym okresie po transplantacji, ale nie zapobiega gromadzeniu się limfocytów T w późniejszym okresie i szybkiemu odrzuceniu przeszczepu (Walczak i wsp., 2007). Podobnie, przeszczep komórek neuralnych izolowanych z płodów świni do mózgu szczurów poddanych immunosupresji CsA, przeżywał 2-4 tygodnie. Nie obserwowano przedłużenia przeżycia komórek dawcy w porównaniu ze zwierzętami bez immunosupresji. Odrzuceniu przeszczepionych komórek towarzyszyła silna aktywacja mikrogleju. Jediną różnicą było zmniejszenie liczby limfocytów T w pierwszych 2 tygodniach obserwacji u zwierząt poddanych immunosupresji CsA (Larsson i wsp., 2001; Wennberg i wsp., 2001). Najnowsze wyniki badań przeprowadzonych z udziałem ustalonych linii neuralnych komórek macierzystych izolowanych z ludzkich płodów przeszczepianych szczurom zdrowym lub zwierzętom, u których wcześniej wykonano uszkodzenie mózgu, wykazały aktywację mechanizmów nieswoistych biorcy. Zastosowanie CsA nie miało wpływu na intensywność reakcji astrocytów i mikrogleju, choć autorzy obserwowali nieznaczne przedłużenie przeżycia ludzkich komórek w mózgu szczura (Rota Nodari i wsp., 2010; Hovakimyan i wsp., 2012)

Z uwagi na to, iż zastosowanie CsA w naszym modelu doświadczalnym nie przyniosło pozytywnych wyników przedłużenia przeszczepu ludzkich komórek, inną strategią z wyboru było podanie szczurom trzech leków immunosupresyjnych: CyklosporynaA+Depo-Medrol+Azatiopryna (CsA+Depo+Aza). Wybrany przez nas protokół immunosupresji jest stosowany w klinice, był także stosowany w badaniach eksperymentalnych innych autorów (Pedersen i wsp., 1997; Walczak i wsp., 2004). Wybór tych substancji był podyktowany ich działaniem. Wiadomo, że CsA hamuje aktywację limfocytów T, głównie komórek T regulatorowych, azatiopryna ogranicza proliferację limfocytów T, w mniejszym stopniu także

limfocytów B, metylprednizolon (Depo-Medrol) odpowiada za zmniejszenie syntezy mediatorów zapalenia, hamując aktywację makrofagów/mikrogleju oraz napływ leukocytów poprzez zmniejszenie ich adhezji do śródbłonka naczyń. Substancje CsA+Depo+Aza, działając na różne etapy odpowiedzi gospodarza, hamują aktywację komórek immunologicznie czynnych, w tym limfocytów, makrofagów i komórek prezentujących antygen (APC), powodują zmniejszenie ekspresji antygenów MHC, spadek produkcji cytokin prozapalnych. W naszych badaniach szczury poddane immunosupresji z zastosowaniem CsA+Depo+Aza nie wykazywały istotnych zmian w odpowiedzi immunologicznej w porównaniu ze zwierzętami, którym podawano CsA. Aktywacja komórek odpowiedzi nieswoistej biorcy (makrofagi/mikrogleju, astrocyty, neutrofile) widoczna po 3 dniach była prawdopodobnie związana z reakcją na uraz tkanki spowodowany zabiegiem transplantacji. Silną aktywację tych komórek wraz z towarzyszącą jej immunoreaktywnością IgM obserwowano przez 3 tygodnie po przeszczepie HUCB-NSC. Jedynie pojawienie się limfocytów T było przesunięte w czasie w porównaniu z grupą zwierząt otrzymujących CsA. Komórki CD5<sup>+</sup> były obecne dopiero w drugim tygodniu trwania eksperymentu. Pomimo skojarzonej immunosupresji nie zanotowano przedłużenia przeżycia przeszczepu, co więcej zastosowanie CsA+Depo+Aza było wysoce niekorzystne z punktu widzenia stanu zdrowia zwierząt, co niejednokrotnie utrudniało obserwację. Szczury poddane immunosupresji były apatyczne, szybko traciły ciężar ciała, wykazywały objawy chorobowe ze strony układu oddechowego i pokarmowego. Niektóre zwierzęta musiały zostać uśpione przed zakończeniem eksperymentu ze względów humanitarnych. Skuteczność działania CsA i CsA+Depo+Aza porównywano w badaniach Pedersen'a i wsp. (1997) przeszczepiając komórki hipokampa myszy do mózgu szczura. W mózgu biorców przeszczepu leczonych CsA+Depo+Aza obserwowano mniejszą infiltrację komórek dawcy przez makrofagi i limfocyty T oraz zmniejszoną ekspresję antygenów MHC klasy I i II na komórkach gospodarza w porównaniu do zwierząt, które otrzymywały CsA. Zastosowanie CsA+Depo+Aza nieznacznie wydłużyło czas przeżycia przeszczepu do 3 tygodni, ale nie zapobiegło eliminacji komórek dawcy. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy przeszczepiając ludzkie komórki krwi pępowinowej do mózgu szczura (Walczak i wsp., 2004; Pan i wsp., 2005).

Z powodu licznych niepowodzeń w doświadczeniach przeszczepiania komórek ksenogenicznych u zwierząt, gdzie po zastosowaniu różnych metod immunosupresji nie uzyskano przedłużenia przeżycia komórek dawcy, bardzo duży entuzjazm wzbudziły w środowisku naukowym wyniki badań Kelly i wsp. (2009). Autorzy tych badań opisali, że preimmunizacja nowonarodzonych szczurów prekursorami neuralnymi wyizolowanymi z mózgu ludzkich płodów (hFNP, *human fetal neural precursors*) powoduje swoistą akceptację tych komórek przeszczepionych do prądkowia zwierzętom dorosłym. Żywe hFNP obserwowano w mózgu szczurów po 40 tygodniach od momentu przeszczepienia, co więcej komórki te różnicowały się w dojrzałe neurony i astrocyty. Dotychczas żadna z grup badawczych nie potwierdziła tych wyników.

Próby wykorzystania opisanej przez Kelly i wsp. metody preimmunizacji szczurów w celu odczulenia biorców w naszym modelu doświadczalnym okazały się nieskuteczne. Przeszczepione do mózgu szczurów, po wcześniejszej preimmunizacji, komórki HUCB-NSC zostały wyeliminowane w ciągu 2 tygodni, wzbudzając silną reakcję zarówno komórek odpowiedzi immunologicznej wrodzonej (mikroglej, astrocyty, neutrofile) jak i komórek odpowiedzi adaptacyjnej (limfocyty T). Podobne wyniki otrzymali inni autorzy podając prekursorów komórek glejowych otrzymanych z mózgu ludzkich płodów (hGRP, *human glial-restricted precursors*), myszom, po wykonanej w okresie neonatalnym preimmunizacji (Janowski i wsp., 2012). W badaniach z użyciem metod bioluminescencji wykazano, że hGRP przeżywały w mózgu myszy 2-4 tygodni. Jednocześnie, w pierwszych dniach po przeszczepie

autorzy obserwowali aktywację mikrogleju i astrocytów, a w kolejnych dniach masywne nacieki limfocytów w okolicy przeszczepów komórek ludzkich.

Wcześniejsze badania eksperymentalne wykazały, że podanie w okresie neonatalnym komórek allogenicznych biorcom przeszczepów narządów wywołuje tolerancję na przeszczep, natomiast próby odczulenia zwierząt komórkami ksenogenicznymi powodowały nadostre odrzucenie przeszczepów u 4-tygodniowych biorców (Shen i wsp., 1996; Butler i wsp., 2000). W przypadku przeszczepów allogenicznych preimmunizacja biorców w okresie neonatalnym powoduje stymulację mechanizmów pamięci immunologicznej i tolerancję na przeszczep, co skutkuje jego akceptacją lub przedłużeniem przeżycia. Z uzyskanych przez nas i innych autorów badań wynika, iż podanie komórek nowonarodzonym zwierzętom w celu wywołania tolerancji na przeszczep nie jest „świętym Graalem” w badaniach przedklinicznych z użyciem komórek ksenogenicznych.

Mechanizm rozpoznania i eliminacji komórek ksenogenicznych po ich transplantacji nie został jak dotąd wyjaśniony. Krótkotrwałe przeżycie ksenoprzeszczepów w organizmie biorcy może być efektem negatywnego działania mikrośrodowiska, które z jednej strony nie zapewnia komórkom macierzystym fizjologicznych warunków niszy, a z drugiej strony działa niszcząco na „intruza”. W naszych wcześniejszych badaniach zaobserwowaliśmy, iż stworzenie trójwymiarowych struktur z wykorzystaniem szkieletów keratyny ułatwia komórkom HUCB-NSC różnicowanie *in vitro* w dojrzałe funkcjonalnie neurony wykazujące potencjał elektryczny (Jurga i wsp., 2009). Wyniki badań innych autorów wykazały dostępność licznych biomateriałów służących do opracowania platform spełniających dla komórek funkcje podporowe (komórki umieszczone na powierzchni) lub integracyjne (komórki zlokalizowane wewnątrz szkieletu). Porowate struktury platform integracyjnych zapewniają ułatwioną migrację komórek do wnętrza, ich przyleganie, wzajemny kontakt i swobodny transport substancji odżywczych i tlenu (Drury i wsp., 2003; Tripathi i wsp., 2009). Ostatnio okazało się, że naturalne polimery stanowią przedmiot dużego zainteresowania z uwagi na podobieństwo do białek macierzy zewnątrzkomórkowej (ECM, *extracellular matrix*), możliwość biodegradacji oraz niską toksyczność.

W naszych badaniach prowadzonych we współpracy z ośrodkami zagranicznymi zaproponowaliśmy stworzenie trójwymiarowych (3D) agregatów stanowiących ludzkie komórki hodowane na szkieletach polimerowych. Pierwszy etap badań dotyczył optymalizacji warunków otrzymywania agregatów komórek z wykorzystaniem nisko- i wysoko-usieciowanych szkieletów dekstranowych i żelatynowych. Ocena komórek wewnątrz struktur polimerowych, przeprowadzona w mikroskopie świetlnym i konfokalnym pozwoliła na wybór wysoko-usieciowanych szkieletów żelatynowych stanowiących platformy dla HUCB-NSC do dalszych eksperymentów. Dodatkowo szkielety żelatynowe były pokryte lamininą. Wybór lamininy, która stanowi główny składnik ECM mózgu, podyktowany był wcześniejszymi obserwacjami *in vitro*, gdzie dodatek lamininy do medium hodowlanego powodował wzrost i różnicowanie ludzkich neuralnych komórek macierzystych (Zimmermann i wsp., 2008). Nasze badania *in vitro* z wykorzystaniem szkieletów żelatynowych pokrytych lamininą wykazały gromadzenie hodowanych w ich obecności HUCB-NSC, proliferację i różnicowanie w dojrzałe neurony i astrocyty. Zastosowanie szkieletów żelatynowych pokrytych lamininą (G/L) stworzyło *in vivo* możliwość zapewnienia przeszczepionym HUCB-NSC struktury przypominającej niszę, ponadto pozwoliło stworzyć barierę mechaniczną chroniącą komórki dawcy przed napływem komórek żernych biorcy, co może zapewnić przeżycie przeszczepionym komórkom w początkowym okresie po transplantacji. Obecne wewnątrz szkieletów, podane do mózgu zdrowego szczura, w postaci 3D agregatów komórki HUCB-NSC wykazywały aktywność mitotyczną. Wśród komórek



dawcy obecnych w agregatach większość stanowiły komórki niezróżnicowane. Nie stwierdzono fenotypów dojrzałych komórek neuralnych. Po przeszczepie 3D agregatów do mózgu szczurów po wywołanym wcześniej uszkodzeniu prążkowiec *ouabainą*, w populacji HUCB-NSC obserwowano pojedyncze komórki wykazujące wczesne markery neuronalne. Podczas prowadzonej w obu grupach zwierząt obserwacji przeszczepione komórki pozostawały wewnątrz szkieletów G/L. Nie obserwowano migracji komórek dawcy do otaczającej tkanki. Transplantacji HUCB-NSC na platformach żelatynowych towarzyszył odczyn zapalny ze strony gospodarza. Dookoła przeszczepionego 3D agregatu z komórkami HUCB-NSC widoczna była aktywacja mikrogleju i astrocytów biorcy, intensywność reakcji immunologicznej była jednak dużo mniejsza niż w przypadku transplantacji komórek ludzkich w zawieszynie. Pojedyncze komórki GFAP<sup>+</sup> były obserwowane wewnątrz szkieletów. Degradacja platform G/L po 7 dniach od momentu ich transplantacji powodowała prawdopodobnie jednoczesną eliminację komórek dawcy. Po 2 tygodniach od implantacji 3D agregatów z komórkami HUCB-NSC nie obserwowano żywych komórek w miejscu przeszczepu. Tak szybka biodegradacja szkieletów żelatynowych w mózgu szczura może być efektem działania mikrogleju a nie komórek ludzkich, gdyż w badaniach *in vitro* struktury szkieletu z komórkami HUCB-NSC były zachowane przez 4 tygodnie. Takie sugestie wykazały też badania Nakanishi (Nakanishi i wsp., 2003). Ponadto ograniczona odpowiedź immunologiczna biorcy, widoczna w postaci mniejszej infiltracji 3D agregatów przez komórki mikrogleju i astrocyty, obserwowanej także przez innych autorów (Deguchi i wsp., 2006; Delcroix i wsp., 2010) wydaje się być interesującym aspektem zastosowania bioaktywnych platform jako nośników komórek przeszczepianych w celach terapeutycznych do OUN. Pozostaje jednak do rozwiązania kwestia stymulacji komórek dawcy do proliferacji i różnicowania po ich transplantacji w postaci 3D agregatów.

### 6.3. Stymulacja neurogenezy w mózgu szczura po transplantacji komórek egzogennych

Badania wielu autorów dowiodły, że przeszczep komórek u zwierząt po uszkodzeniu mózgu powoduje poprawę stanu ogólnego w postaci ograniczenia wcześniejszych deficytów motorycznych i kognitywnych. Co ciekawe, niejednokrotnie miało to miejsce u zwierząt, u których w mózgu nie obserwowano obecności komórek dawcy. Podobne efekty notowano u gryzoni po transplantacji komórek dożylnie, dotętniczo lub dootrzewnowo (Willing i wsp. 2003; Vendrame i wsp., 2004; Xiao i wsp., 2005; Meier i wsp., 2006; Górnicka-Pawlak i wsp., 2011). Jednocześnie wraz z poprawą upośledzonych w wyniku ischemii funkcji ruchowych, obserwowano zmniejszenie obszarów lezji w mózgu. Sugeruje to możliwość pośredniego działania (*bystander effect*) przeszczepionych komórek, promującego endogenne procesy naprawcze, w tym stymulację neurogenezy.

Analiza rejonów neurogennych przeprowadzona w naszych badaniach wykazała wzrost proliferacji komórek w strefie SVZ i SGZ u szczurów po uszkodzeniu prążkowiec *ouabainą*. Transplantacja HUCB-NSC dodatkowo stymulowała podziały komórek endogennych (BrdU<sup>+</sup>; Ki67<sup>+</sup>) w obu tych rejonach półkuli tożsamej z uszkodzeniem. Jednocześnie wykazano zwiększenie liczby neuroblastów (PSA-NCAM<sup>+</sup>; DCX<sup>+</sup>) i ich migrację z SVZ w kierunku miejsca uszkodzenia. Stymulację neurogenezy po przeszczepieniu progenitorów neuralnych do mózgu gryzoni opisali inni autorzy (Kang i wsp., 2009; Zhang i wsp., 2011; Mora-Lee i wsp., 2012). Zwiększony poziom proliferacji komórek w strefie SVZ był widoczny, podobnie jak w naszych badaniach, przez 2 tygodnie po przeszczepieniu komórek. Wśród migrujących komórek obserwowano komórki wykazujące markery proliferacji (Zhang i wsp., 2007). Mechanizm migracji progenitorów neuralnych w procesach patologicznych OUN nie został dokładnie poznany. Istnieje wiele czynników odpowiedzialnych za ten proces, w tym oprócz

chemoatraktantów (cytokin pro-zapalnych i chemokin), istotną rolę odgrywają metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP). Regulacyjny wpływ MMP na proces migracji komórek ze strefy SVZ do lezji sugerują wyniki eksperymentalne wielu autorów (Tsukatani i wsp. 2003; Zhao i wsp. 2006; Lee i wsp. 2006; Wojcik i wsp., 2009). Uzyskana w moich badaniach podwyższona aktywność MMP 2/9 w komórkach wykazujących obecność markerów charakterystycznych dla młodych migrujących neuroblastów (DCX), w porównaniu do innych komórek tkanki, wydaje się potwierdzać opisane powyżej obserwacje. Na uwagę zasługuje różna lokalizacja aktywności MMP 2/9 w komórkach migrujących (DCX<sup>+</sup>) i w komórkach proliferujących (BrdU<sup>+</sup>). W przypadku komórek BrdU<sup>+</sup> obecność metaloproteinaz widoczna była jedynie w jądrze komórkowym, co jest zgodne z wcześniejszymi doniesieniami innych grup badawczych (Amantea i wsp., 2008; Yang i wsp., 2010). Taka lokalizacja może świadczyć o udziale MMP w regulacji cyklu komórkowego, co zostało potwierdzone w badaniach *in vitro*. Zastosowanie inhibitora aktywności MMP (SB-3CT) skutkowało zahamowaniem proliferacji ludzkich neuralnych komórek macierzystych krwi pępowinowej (Szymczak i wsp., 2010; Wojcik-Stanaszek i wsp., 2011). Co ciekawe, w migrujących neuroblastach aktywność MMP widoczna była również w cytoplazmie, w wypustkach komórkowych, a także w przestrzeni zewnątrzkomórkowej dookoła komórek DCX<sup>+</sup>. Synteza MMP przez nowopowstałe neuroblasty ułatwia ich migrację z rejonów neurogennych do miejsc uszkodzenia poprzez przemodelowanie struktury macierzy zewnątrzkomórkowej w tkance. Wyniki badań *in vitro* wykazały, że zmiany budowy i kompozycji ECM wpływają nie tylko fizycznie na procesy migracji czy wzrost neurytów, ale także na przekazywanie specyficznych sygnałów poprzez koncentrację czynników troficznycy i ich bezpośrednie działanie na progenitory neuralne (Aizman i wsp., 2009; Li i wsp., 2009; Zychowicz i wsp., 2012).

#### 6.4. Analiza ekspresji czynników neurotroficznycy w mózgu szczura po ischemii i transplatacji komórek

Wyniki badań prowadzonych dotychczas prac wykazały istotną rolę czynnikóy wzrostowycy w regulacji procesóy naprawczych po uszkodzeniu mózgu wywołanym niedotlenieniem. Badania u gryzoni poddanych niedotlenieniu mózgu pozwoliły wskazać grupy czynnikóy, których ekspresja wzrasta w stanach patologicznycy. Czynniki te wykazują działanie neurotroficzne, neuroprotekcycne, antyapoptocyne i angiogenne w badaniach *in vitro*. Stymulację proliferacji endogennycy neuralnych komórek macierzystycy i zwiększenie przeżywalności powstałycy neuroblastóy, czemu towarzyszył wzrost ekspresji czynnikóy neurotroficznycy, opisano w modelu uszkodzenia mózgu MCAO u szczura (Kitagawa i wsp., 1999; Dempsey i wsp., 2003; Lichterwalner i wsp., 2006). Do najczęściej badanych czynnikóy wzrostu w eksperymentalnych modelach ischemii należą: BDNF, GDNF, EGF, FGF-2, VEGF, IGF-1. Szereg artykułóy przeglądowycy zawiera informacje dotyczące znaczenia tych czynnikóy w procesach neurogenezy po uszkodzeniu mózgu (Cairns i wsp., 2003; Greenberg i wsp., 2006; Dempsey i Kalluri 2007; Grote i wsp., 2007; Kalluri i Dempsey 2008).

W naszych badaniach, po uszkodzeniu prądkowia ouabainą widoczny był wzrost ekspresji czynnikóy takich jak: BDNF, GDNF, NT-3, CNTF, EGF, HGF, IGF-1 w mózgu szczura, w rejonie uszkodzenia i zwiększenie liczby komórek BrdU<sup>+</sup> w strefach SVZ i SGZ, w porównaniu do poziomu ekspresji tych czynnikóy w mózgu zwierząt zdrowycy.

Podobnie, zwiększenie ekspresji czynnikóy troficznycy obserwowano w pracach innycy autoróy. Przejściowy wzrost immunoreaktywności komórek BDNF<sup>+</sup> w rejonie penumbry, stwierdzono 12 godzin po okluzji tętnicy szyjnej u szczura (Ferrer i wsp., 2001). Autorzy

postulują, iż BDNF promuje przeżycie neuronów i zapobiega ich śmierci, poprzez stymulację ekspresji receptorów TrkB w obszarze półcienia. Czasowe niedokrwienie powoduje także wzrost ilości GDNF w mózgu (Takami i wsp., 1992; Kokaia i wsp., 1995; Lin i wsp., 1997; Kitagawa i wsp., 1999). Protekcyjny efekt GDNF wiąże się z jego działaniem antyapoptotycznym (Shang i wsp., 2010). W badaniach innych autorów odnotowano po ischemii zwiększenie ekspresji czynników wzrostu, które mają szersze, wielofunkcyjne działanie w stosunku do różnych rodzajów komórek np. HGF, EGF, FGF-2, IGF-1. Większość z nich wykazuje efekt neurotroficzny w obecności klasycznych czynników wzrostu, mających powinowactwo tylko do komórek nerwowych takich jak GDNF. W krótkim czasie po niedokrwieniu wzrasta ekspresja genów dla EGF i FGF-2 w uszkodzonym rejonie mózgu (Endoh i wsp., 1994; Lin i wsp., 1997; Hayashi i wsp., 2003). Czynniki te mają właściwości mitogenne, promują wytwarzanie nowych neuronów, zwiększając pulę komórek macierzystych w strefie SVZ u dorosłych gryzoni (Kuhn i wsp., 1997; Zheng i wsp., 2004). Wraz ze wzrostem poziomu EGF i FGF-2 obserwowano wzrost ekspresji specyficznych dla nich receptorów na komórkach progenitorowych (Ninomiya i wsp., 2006). Insulino-podobny czynnik wzrostu-1 (IGF-1) to kolejny z czynników, którego ekspresja wzrasta po hipoksji (Gluckman i wsp., 1992; Zhang i wsp., 2004; Yan i wsp., 2006). Yan i wsp. wykazali wzrost ekspresji mRNA dla IGF-1 w reaktywnych astrocytach w rejonie półcienia, zarówno w korze jak i prążkowie, u zwierząt z przejściowym niedotlenieniem mózgu (Yan i wsp., 2006). Okazało się, że zwiększenie aktywności metaloproteinaz powoduje proteolityczną degradację kompleksu IGFBP3 i uwolnienie IGF-1 (Fowlkes i wsp., 2004). Dodatkowo, niedokrwienie ogniskowe powoduje aktywację białek wiążących oraz transportujących IGF-1 i wzrost ekspresji receptora dla IGF-1 na komórkach progenitorowych w strefach SVZ i SGZ w mózgu szczura (Yan i wsp., 2007).

Przeszczep komórek u zwierząt po ischemii powoduje dodatkowo zwiększenie poziomu endogennych czynników neurotroficznych stymulowanych wcześniej uszkodzeniem mózgu. W naszych badaniach, po transplantacji komórek HUCB-NSC szczurom w modelu uszkodzenia prążkowiec ouabainą, obserwowaliśmy wzrost czynników troficznych w okolicy lezji. Profil ekspresji czynników troficznych uzyskany w moich badaniach wydaje się w sposób logiczny korelować z zapotrzebowaniem działania poszczególnych czynników w obszarze uszkodzenia mózgu i ich funkcją. Pierwszego dnia po transplantacji HUCB-NSC wzrasta ilość mRNA dla czynników o działaniu anty-apoptotycznym: HGF, IGF-1, presapozyna. Po kilku dniach od przeszczepu widoczny jest wzrost ekspresji czynników mitogennych: BDNF, GDNF, NT3, odpowiedzialnych za proliferację progenitorów neuralnych i protekcję dojrzałych neuronów. W dalszym okresie obserwacji zwiększeniu ulega poziom czynników takich jak: CNTF, semaforyna biorących udział w procesach funkcjonalnego różnicowania neuronów, związanych z synaptogenezą, tworzeniem nowych dendrytów.

Wzrost ekspresji endogennych czynników wzrostu obserwowano po przeszczepie komórek ludzkich u gryzoni w modelu niedokrwienia MCAO. Ten efekt był niezależny od drogi podania komórek dawcy. Zwiększenie poziomu BDNF, NT-3, VEGF stwierdzono po uszkodzeniu mózgu i transplantacji ludzkich komórek krwi pępowinowej do półkuli ipsilateralnej gryzoni (Bao i wsp., 2011; Rosenkranz i wsp., 2012). Badania Borlongan'a i wsp. wykazały, że dożylnie podanie komórek ludzkiej krwi pępowinowej powodowało wzrost ekspresji BDNF, GDNF i NGF w mózgu szczurów po ischemii, w porównaniu ze zwierzętami, które nie otrzymywały przeszczepu (Borlongan i wsp., 2004). Podobnie, po podaniu obwodowo ludzkich komórek mezenchymalnych szczurom poddanym zabiegowi niedokrwienia mózgu, obserwowano zwiększoną ekspresję endogennych czynników troficznych takich jak: EGF, FGF-2, VEGF (Wakabayashi i wsp., 2010). Wraz ze wzrostem ilości endogennych czynników neurotroficznych

w rejonie uszkodzenia, zanotowano zwiększenie liczby komórek proliferujących, młodych neuronów, ograniczenie obszaru lezji i poprawę stanu ogólnego zwierząt.

Mechanizm pozytywnego działania egzogennych komórek po ich przeszczepie do OUN nie został szczegółowo wyjaśniony. Komórki neuralne i mezenchymalne izolowane z różnych źródeł uwalniają szereg substancji, wśród nich: NGF, BDNF, GDNF, FGF-2, VEGF, HGF, CNTF (Kurozumi i wsp., 2005; Chen i wsp., 2005; Caplan i wsp., 2006; Maltman i wsp., 2011). Z badań *in vitro* wynika, że komórki krwi pępowinowej mają zdolność syntezy czynników neurotroficznycych w tym: BDNF, GDNF, NGF (Fan i wsp., 2005). To pozwala przypuszczać, iż HUCB zachowują tę zdolność po przeszczepieniu do mózgu, modyfikując mikrośrodowisko tkanki nerwowej poprzez uwolnione czynniki troficzne. W naszych badaniach po transplantacji HUCB-NSC do istoty białej szczura, stwierdziliśmy obecność czynników wzrostu pochodzenia ludzkiego w okolicy uszkodzenia mózgu. Poziom wszystkich badanych czynników takich jak: BDNF, GDNF, NT-3, CNTF, HGF, IGF-1, presapozyny, semaforyny był znacznie wyższy niż w komórkach HUCB-NSC hodowanych *in vitro*. Ekspresja egzogennych czynników troficznych w mózgu szczura była widoczna przez 7 dni, do momentu eliminacji komórek dawcy. Obecność czynników troficznych pochodzenia dawcy po przeszczepie ludzkich mezenchymalnych komórek szczurom w modelu niedokrwienia MCAO opisał Wakabayashi i wsp. (2010). Jedynym czynnikiem pochodzenia ludzkiego, jaki stwierdzono w mózgu szczura 3 dni po przeszczepie był IGF-1. Nie wiadomo czy egzogenne czynniki wzrostu produkowane przez przeszczepione komórki dawcy działają bezpośrednio na komórki gospodarza, w tym również na progenitory neuralne stymulując neurogenezy, czy też aktywują astrocyty i komórki mikrogleju, które wydzielając endogenne substancje zwiększające proliferację i różnicowanie komórek w OUN.

Wielu autorów badań podkreśla istotną rolę współdziałania przeszczepianych progenitorów neuralnych z komórkami mikrogleju, podając sprzeczne wyniki, będące efektami wzajemnego działania. Z jednej strony transplantacja ludzkich komórek powoduje zwiększenie liczby makrofagów/mikrogleju i ich aktywację, co w efekcie wiąże się z poprawą upośledzonych w wyniku uszkodzenia mózgu funkcji motorycznych (Capone i wsp., 2007; Daadi i wsp., 2010). Zgodnie z hipotezą autorów tych badań aktywacja mikrogleju jest konieczna do wywołania działania neuroprotekcijnego komórek dawcy poprzez uwolnienie czynników takich jak: BDNF, IGF-1, VEGF i TGF- $\beta$ . Potwierdzeniem tej hipotezy są wyniki badań, gdzie u myszy - biorców przeszczepu pozbawionych komórek mikrogleju, obszar uszkodzenia mózgu po ischemii był dużo większy w porównaniu ze zwierzętami typu dzikiego (Lalancette-Hebert i wsp., 2007). Z drugiej strony wyniki badań dwóch innych grup autorów wskazują, iż po przeszczepie progenitorów neuralnych ma miejsce znaczne ograniczenie liczby komórek mikrogleju w mózgu po uszkodzeniu, co zwiększa przeżycie neuronów i poprawia upośledzone funkcje ruchowe zwierząt (Lee i wsp., 2008; Bacigaluppi i wsp., 2009). Bez względu na przyjęcie jednej czy drugiej hipotezy, efektem transplantacji komórek neuralnych jest stymulacja procesów naprawczych w OUN poprzez wielokierunkowe działania pośrednie.

Pomimo, iż niektórzy autorzy opisują niską immunogenność komórek ludzkiej krwi pępowinowej w badaniach *in vitro*, uprzywilejowanie immunologiczne tych komórek *in vivo* budzi sporo kontrowersji. Wyniki naszych badań, a także inne doniesienia z dostępnych źródeł literatury wskazują, że przeszczep ludzkich komórek macierzystych izolowanych z krwi pępowinowej do mózgu dorosłego szczura jest odrzucany, a ksenogeniczne komórki dawcy podlegają całkowitej eliminacji. Proces zapalny wywołany uszkodzeniem powstającym w wyniku niedotlenienia mózgu, manipulacje chirurgiczne towarzyszące transplantacji komórek, przeszczep komórek pomiędzy dawcą i biorcą różniącymi się antygenami zgodności tkankowej są niekorzystne zarówno dla komórek biorcy jak i komórek dawcy.

Pozytywny efekt przeszczepionych komórek może być wynikiem ich niespecyficznego działania parakrynnego poprzez uwalnianie czynników troficznych, neuromorfofenów, czynników antyapoptotycznych, immunomodulacyjnych, cytokin przeciwzapalnych i stymulację endogennych procesów naprawczych.

## 7. PODSUMOWANIE

---

- Przeszczepione do mózgu dorosłego szczura ludzkie progenitory neuralne krwi pępowinowej (HUCB-NSC) w większości pozostają w miejscu wszczepu, mają niski stopień proliferacji i ograniczoną zdolność migracji. Nie wykazują ekspresji antygenów typowych dla dojrzałych neuronów, krótko przeżywają w mózgu biorców, są eliminowane po 10-14 dniach.
- Analiza parametrów miejscowej odpowiedzi immunologicznej w mózgu szczurów po uszkodzeniu ouabainą i transplantacji HUCB-NSC wskazuje na pobudzenie efektorów zarówno wrodzonej (nieswoistej) jak i adaptacyjnej (swoistej) reakcji gospodarza. Zastosowanie immunosupresji (CsA; CsA+DepoMedrol+Azatioprina) i odczulanie biorców nie wpływa na wielkość odpowiedzi immunologicznej i nie przedłuża przeżycia przeszczepu.
- Przeszczep komórek ludzkich (HUCB-NSC) w postaci 3D agregatów na platformach polimerowych zapewnia przeżycie komórkom dawcy, ograniczając odczyn zapalny. Pozostające wewnątrz struktur komórki są żywe, dzielą się, różnicując w młode neurony, jednak nie opuszczają swojej „niszy” i nie migrują do tkanki, a po biodegradacji szkieletów są eliminowane.
- Pobudzenie neurogenezy w mózgu szczura po uszkodzeniu ouabainą jest dodatkowo wzmacnione przez przeszczep ludzkich progenitorów neuralnych (HUCB-NSC). Wraz ze wzrostem proliferujących w strefach SVZ i SGZ endogennych komórek, obserwuje się zwiększenie liczby migrujących w kierunku uszkodzenia neuroblastów i podwyższenie aktywności metaloproteinaz.
- Transplantacja komórek ludzkich (HUCB-NSC) u zwierząt po ischemii powoduje dodatkowo zwiększenie poziomu endogennych czynników neurotroficznych, stymulowanych wcześniej uszkodzeniem OUN. Przeszczepione progenitory neuralne są także źródłem ludzkich czynników troficznych, których obecność stwierdza się w mózgu biorców po transplantacji.

## 8. WNIOSKI

---

- Krótkotrwałe przeżycie ludzkich progenitorów neuralnych po ich przeszczepieniu do mózgu szczurów nie pozwala na podjęcie funkcji repulacji uszkodzonych struktur nerwowych, z uwagi na szybką eliminację komórek dawcy przez komórki immunologiczne gospodarza.
- W świetle naszych badań pozytywne efekty transplantacji komórek, obserwowane wcześniej w testach behawioralnych są wynikiem pośredniego działania egzogennych komórek (uwalnianie czynników wzrostu, neuromorfofenów, czynników anty-apoptotycznych i immunomodulacyjnych), korzystnego z punktu widzenia stymulacji endogennych procesów naprawczych w uszkodzonej tkance.
- Zapewnienie optymalnego mikrośrodowiska do proliferacji, migracji i różnicowania endogennych progenitorów neuralnych, a także ochronnego działania w stosunku do dojrzałych neuronów wydaje się najważniejszym celem terapii z zastosowaniem przeszczepów komórek somatycznych w chorobach OUN.

## 9. SPIS PIŚMIENNICTWA

- Airavaara M, Chiocco MJ, Howard DB, Zuchowski KL, Peränen J, Liu C, Fang S, Hoffer BJ, Wang Y, Harvey BK. Widespread cortical expression of MANF by AAV serotype 7: localization and protection against ischemic brain injury. *Exp Neurol*. 2010 Sep;225(1):104-113
- Aizman I, Tate CC, McGrogan M, Case CC. Extracellular matrix produced by bone marrow stromal cells and by their derivative, SB623 cells, supports neural cell growth. *J Neurosci Res*. 2009 Nov 1;87(14):3198-3206
- Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wüthrich B, Blaser K. Role of interleukin-10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998; 102: 98–106
- Ali H, Jurga M, Kurgonaitė K, Forraz N, McGuckin C. Defined serum-free culturing conditions for neural tissue engineering of human cord blood stem cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2009;69(1):12-23
- Allen CL, Bayraktutan U Risk factors for ischaemic stroke. *Int J Stroke*. 2008 May;3(2):105-116
- Amantea D, Corasaniti MT, Mercuri NB, Bernardi G, Bagetta G. Brain regional and cellular localization of gelatinase activity in rat that have undergone transient middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience* 2008; 152(1):8-17
- Andrews PW, Damjanov I, Simon D, Banting GS, Carlin C, Dracopoli NC, Føgh J. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab Invest*. 1984 Feb;50(2):147-162
- Arai H, Passonneau JV, Lust WD. Energy metabolism in delayed neuronal death of CA1 neurons of the hippocampus following transient ischemia in the gerbil. *Metab Brain Dis*. 1986 Dec;1(4):263-278
- Armstrong RJ, Harrower TP, Hurelbrink CB, McLaughlin M, Ratcliffe EL, Tyers P, Richards A, Dunnett SB, Rosser AE, Barker RA. Porcine neural xenografts in the immunocompetent rat: immune response following grafting of expanded neural precursor cells. *Neuroscience*. 2001;106(1):201-216
- Arumugam TV, Granger DN, Mattson MP: Stroke and T-cells. *Neuromolecular Medicine* 2005; 7:229-242
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999 Aug 6;85(3):221-228
- Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*. 1981 Nov-Dec;12(6):723-725
- Ay H, Ay I, Joroshetz WJ, Finklestein SP. Potential usefulness of basic fibroblast growth factor as a treatment for stroke. *Cerebrovascular Dis* 1999; 9:131–135
- Bacigaluppi M, Pluchino S, Peruzzotti-Jametti L, Kilic E, Kilic U, Salani G, Brambilla E, West MJ, Comi G, Martino G, Hermann DM. Delayed post-ischaemic neuroprotection following systemic neural stem cell transplantation involves multiple mechanisms. *Brain*. 2009 Aug;132(Pt 8):2239-2251
- Baldauf K, Reymann KG Influence of EGF/bFGF treatment on proliferation, early neurogenesis and infarct volume after transient focal ischemia *Brain Res*. 2005 Sep 21;1056(2):158-167
- Bang O.Y., Lee J.S., Lee P.H., Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann. Neurol*. 2005; 57: 874–882
- Banwell V, Sena ES, Macleod MR. Systematic review and stratified meta-analysis of the efficacy of interleukin-1 receptor antagonist in animal models of stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2009; 18: 269–276

- Bao X, Wei J, Feng M, Lu S, Li G, Dou W, Ma W, Ma S, An Y, Qin C, Zhao RC, Wang R. Transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes behavioral recovery and endogenous neurogenesis after cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 2011 Jan 7;1367:103-113
- Barker RA, Ratcliffe E, McLaughlin M, Richards A, Dunnett SB. A role for complement in the rejection of porcine ventral mesencephalic xenografts in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 2000; 20:3415–3424
- Barnum SR. Inhibition of complement as a therapeutic approach in inflammatory central nervous system (CNS) disease. *Mol Med.* 1999 Sep;5(9):569-582
- Barone FC, Feuerstein GZ. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 819–834
- Barone FC, Irving EA, May AM, Lee JC, Kassis S, Kumar S, Badger AM, White RF, McVey MJ, Legos JJ, Erhardt JA, Nelson AH, Ohlstein EH, Hunter AJ, Ward K, Smith BR, Adams JL, Parsons AA. SB 239063, a second generation p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, reduces brain injury and neurological deficits in cerebral focal ischemia. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2001; 296:312-321
- Bath KG, Lee FS. Neurotrophic factor control of adult SVZ neurogenesis. *Dev Neurobiol.* 2010 Apr;70(5):339-349
- Beck H, Plate KH. Angiogenesis after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol.* 2009 May;117(5):481-496
- Becker K, Kindrick D, Relton J, Harlan J, Winn R. Antibody to the alpha4 integrin decreases infarct size in transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2001; 32: 206–211
- Beech JS, Reckless J, Mosedale DE, Grainger DJ, Williams SCR, Menon DK. Neuroprotection in ischemia-reperfusion injury: An anti-inflammatory approach using a novel broad-spectrum chemokine inhibitor. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2001; 21:683-689
- Benavides A, Pastor D, Santos P, Tranque P, Calvo S. CHOP plays a pivotal role in the astrocyte death induced by oxygen and glucose deprivation. *Glia* 2005; 52: 261–275
- Bergwerf I, Tambuyzer B, De Vocht N, Reekmans K, Praet J, Daans J, Chatterjee S, Pauwels P, Van der Linden A, Berneman ZN, Ponsaerts P. Recognition of cellular implants by the brain's innate immune system. *Immunol Cell Biol.* 2011 May;89(4):511-516
- Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999 Jun;19(6):643-651
- Bersano A, Ballabio E, Lanfranconi S, Boncoraglio GB, Corti S, Locatelli F, Baron P, Bresolin N, Parati E, Candelise L. Clinical studies in stem cells transplantation for stroke: a review. *Curr Vasc Pharmacol.* 2010 Jan;8(1):29-34
- Besancon E, Guo S, Lok J, Tymianski M, Lo EH. Beyond NMDA and AMPA glutamate receptors: emerging mechanisms for ionic imbalance and cell death in stroke. *Trends Pharmacol Sci.* 2008; May;29(5):268-275
- Bilbo SD, Schwarz JM. Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system. *Front Behav Neurosci.* 2009;3:14
- Billingham Re, Boswell T. Studies on the problem of corneal homografts. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1953 Jul 15;141(904):392-406
- Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK. Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke.* 2007 Feb;38(2 Suppl):817-826
- Bogousslavsky J, Victor SJ, Salinas EO, Pallay A, Donnan GA, Fieschi C, Kaste M, Orgogozo JM, Chamorro A, Desmet A; European-Australian Fibrinolytic (Trafermin) in Acute Stroke Group. Fibrinolytic



- (trafermin) in acute stroke: results of the European-Australian phase II/III safety and efficacy trial. *Cerebrovas Dis* 2002; 14:239–251
- Borlongan CV, Tajima Y, Trojanowski JQ, Lee VM, Sanberg PR. Transplantation of cryopreserved human embryonal carcinoma-derived neurons (NT2N cells) promotes functional recovery in ischemic rats. *Exp Neurol*. 1998 Feb;149(2):310-321
  - Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, Sanberg PR. Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. *Stroke*. 2004 Oct;35(10):2385-2389
  - Brundin P, Widner H, Nilsson OG, Strecker RE, Björklund A. Intracerebral xenografts of dopamine neurons: the role of immunosuppression and the blood-brain barrier. *Exp Brain Res*. 1989;75(1):195-207
  - Budd SL, Lipton SA Calcium tsunamis: do astrocytes transmit cell death messages via gap junctions during ischemia? *Nat Neurosci*. 1998 Oct;1(6):431-432
  - Bühnemann C, Scholz A, Bernreuther C, Malik CY, Braun H, Schachner M, Reymann KG, Dihné M. Neuronal differentiation of transplanted embryonic stem cell-derived precursors in stroke lesions of adult rats. *Brain* 2006; 129: 3238–3248
  - Butler PE, Lee WP, van de Water AP, Randolph MA. Neonatal induction of tolerance to skeletal tissue allografts without immunosuppression. *Plast Reconstr Surg*. 2000 Jun;105(7):2424-2430
  - Buzanska L, Machaj EK, Zablocka B, Pojda Z, Domanska-Janik K. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. *J Cell Sci*. 2002; 115(Pt 10):2131-2138
  - Buzanska L, Jurga M, Stachowiak EK, Stachowiak MK, Domanska – Janik K. Neural stem-like cell line derived from nonhematopoietic population of human umbilical cord blood. *Stem Cell and Development* 2006; 15(3):391-406
  - Buzanska L, Ruiz A, Zychowicz M, Rauscher H, Ceriotti L, Rossi F, Colpo P, Domańska-Janik K, Coecke S. Patterned growth and differentiation of human cord blood-derived neural stem cells on bio-functionalized surfaces. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2009;69(1):24-36
  - Cairns K, Finklestein SP. Growth factors and stem cells as treatments for stroke recovery. *Phys Med Rehabil Clin N Am*. 2003 Feb;14(1 Suppl):S135-142
  - Candelario-Jalil E, Yang Y, Rosenberg GA Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience*. 2009 Feb 6;158(3):983-994
  - Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006 Aug 1;98(5):1076-1084
  - Capone C, Frigerio S, Fumagalli S, Gelati M, Principato MC, Storini C, Montinaro M, Kraftsik R, De Curtis M, Parati E, De Simoni MG. Neurosphere-derived cells exert a neuroprotective action by changing the ischemic microenvironment. *PLoS One*. 2007 Apr 18;2(4):e373
  - Carrithers MD, Visintin I, Kang SJ, Janeway CA Jr. Differential adhesion molecule requirements for immune surveillance and inflammatory recruitment. *Brain* 2000; 123 (Pt 6), 1092–1101
  - Carroll J. Human cord blood for the hypoxic-ischemic neonate. *Pediatr Res*. 2012 Apr;71(4 Pt 2):459-463
  - Carson CT, Aigner S, Gage FH. Stem cells: the good, bad and barely in control. *Nat Med*. 2006 Nov;12(11):1237-1238
  - Carson MJ, Doose JM, Melchior B, Schmid CD, Ploix CC. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol Rev* 2006; 213: 48–65
  - Chen B, Gao XQ, Yang CX, Tan SK, Sun ZL, Yan NH, Pang YG, Yuan M, Chen GJ, Xu GT, Zhang K, Yuan QL. Neuroprotective effect of grafting GDNF gene-modified neural stem cells on cerebral ischemia in rats. *Brain Res*. 2009 Aug 11;1284:1-11

- Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med*. 2007 Jul;13(7):851-856
- Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, Sanchez-Ramos J, Chopp M. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke*. 2001 Nov;32(11):2682-2688
- Chen J, Li Y, Zhang R, Katakowski M, Gautam SC, Xu Y, Lu M, Zhang Z, Chopp M. Combination therapy of stroke in rats with a nitric oxide donor and human bone marrow stromal cells enhances angiogenesis and neurogenesis. *Brain Res*. 2004 Apr 16;1005(1-2):21-28
- Chen Q, Long Y, Yuan X, Zou L, Sun J, Chen S, Perez-Polo JR, Yang K. Protective effects of bone marrow stromal cell transplantation in injured rodent brain: synthesis of neurotrophic factors. *J Neurosci Res*. 2005 Jun 1;80(5):611-619
- Chen Z, Palmer TD. Cellular repair of CNS disorders: an immunological perspective. *Hum Mol Genet*. 2008 Apr 15;17(R1):R84-92
- Cheng S, Ma M, Ma Y, Wang Z, Xu G, Liu X. Combination therapy with intranasal NGF and electroacupuncture enhanced cell proliferation and survival in rats after stroke. *Neurol Res*. 2009 Sep;31(7):753-758
- Chiaretti A, Antonelli A, Genovese O, Pezzotti P, Rocco CD, Viola L, Riccardi R. Nerve growth factor and doublecortin expression correlates with improved outcome in children with severe traumatic brain injury. *J Trauma* 2008; 65: 80–85
- Choi Y, Borghesani PR, Chan JA, Segal RA. Migration from a mitogenic niche promotes cell-cycle exit. *J Neurosci*. 2005 Nov 9;25(45):10437-10445
- Chopp M, Li Y, Jiang N, Zhang RL, Probst J. Antibodies against adhesion molecules reduce apoptosis after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 16: 578–584
- Chou WH, Choi DS, Zhang H, Mu D, McMahon T, Kharazia VN, Lowell CA, Ferriero DM, Messing RO. Neutrophil protein kinase Cdelta as a mediator of stroke-reperfusion injury. *J Clin Invest*. 2004 Jul;114(1):49-56
- Clausen BH, Lambertsen KL, Babcock AA, Holm TH, Dagnaes-Hansen F, Finsen B. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are expressed by different subsets of microglia and macrophages after ischemic stroke in mice. *J Neuroinflammation* 2008; 23: 5–46
- Coenen M, Kögler G, Wernet P, Brüstle O. Transplantation of human umbilical cord blood-derived adherent progenitors into the developing rodent brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005 Aug;64(8):681-688
- Cohan SL. Pharmacology of calcium-antagonists - clinical relevance in neurology. *European Neurology* 1990; 30:28-30
- Colafrancesco V, Villoslada P. Targeting NGF pathway for developing neuroprotective therapies for multiple sclerosis and other neurological diseases. *Arch Ital Biol*. 2011 Jun;149(2):183-192
- Cotrina ML, Kang J, Lin JH, Bueno E, Hansen TW, He L, Liu Y, Nedergaard M. Astrocytic gap junctions remain open during ischemic conditions. *J Neurosci*. 1998 Apr 1;18(7):2520-2537
- Cova L, Ratti A, Volta M, Fogh I, Cardin V, Corbo M, Silani V. Stem cell therapy for neurodegenerative diseases: the issue of transdifferentiation. *Stem Cells Dev*. 2004 Feb;13(1):121-131
- Coyne TM, Marcus AJ, Woodbury D, Black IB. Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia. *Stem Cells*. 2006 Nov;24(11):2483-2492

- Curtis KM, Gomez LA, Schiller PC. Rac1b regulates NT3-stimulated Mek-Erk signaling, directing marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells toward an early neuronal phenotype. *Mol Cell Neurosci*. 2012; Feb 49(2):138-148
- Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wikkelso C, Holtås S, van Roon-Mom WM, Björk-Eriksson T, Nordborg C, Frisén J, Dragunow M, Faull RL, Eriksson PS. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science*. 2007 Mar 2;315(5816):1243-1249
- Daadi MM, Li Z, Arac A, Grueter BA, Sofilos M, Malenka RC, Wu JC, Steinberg GK. Molecular and magnetic resonance imaging of human embryonic stem cell-derived neural stem cell grafts in ischemic rat brain. *Mol Ther*. 2009 Jul;17(7):1282-1291
- Daadi MM, Davis AS, Arac A, Li Z, Maag AL, Bhatnagar R, Jiang K, Sun G, Wu JC, Steinberg GK. Human neural stem cell grafts modify microglial response and enhance axonal sprouting in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Stroke*. 2010 Mar;41(3):516-523
- Dallner C, Woods AG, Deller T, Kirsch M, Hofmann HD. CNTF and CNTF receptor alpha are constitutively expressed by astrocytes in the mouse brain. *Glia*. 2002 Mar 15;37(4):374-378
- Danton GH, Dietrich WD. The search for neuroprotective strategies in stroke. *American Journal of Neuroradiology* 2004; 25:181-194
- de Paula S, Vitola AS, Greggio S, de Paula D, Mello PB, Lubianca JM, Xavier LL, Fiori HH, Dacosta JC. Hemispheric brain injury and behavioral deficits induced by severe neonatal hypoxia-ischemia in rats are not attenuated by intravenous administration of human umbilical cord blood cells. *Pediatr Res*. 2009 Jun;65(6):631-635
- de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174: 1209–1220
- Deguchi K, Tsuru K, Hayashi T, Takaishi M, Nagahara M, Nagotani S, Sehara Y, Jin G, Zhang H, Hayakawa S, Shoji M, Miyazaki M, Osaka A, Huh NH, Abe K. Implantation of a new porous gelatin-siloxane hybrid into a brain lesion as a potential scaffold for tissue regeneration. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006 Oct;26(10):1263-1273
- Deguchi Y, Naito T, Yuge T, Furukawa A, Yamada S, Pardridge WM, Kimura R. Blood-brain barrier transport of I-125 labeled fibroblast growth factor. *Pharma Res* 2000; 17:63– 69
- Delavaran H, Sjunnesson H, Arvidsson A, Lindvall O, Norrving B, van Westen D, Kokaia Z, Lindgren A. Proximity of brain infarcts to regions of endogenous neurogenesis and involvement of striatum in ischaemic stroke. *Eur J Neurol*. 2012 Oct 11. doi: 10.1111/j.1468-1331.2012.03877
- Delcroix GJ, Schiller PC, Benoit JP, Montero-Menei CN. Adult cell therapy for brain neuronal damages and the role of tissue engineering. *Biomaterials*. 2010 Mar;31(8):2105-2120
- Dempsey RJ, Sailor KA, Bowen KK, Türeyen K, Vemuganti R. Stroke-induced progenitor cell proliferation in adult spontaneously hypertensive rat brain: effect of exogenous IGF-1 and GDNF. *J. Neurochem*. 2003; 87, 586–597
- Dempsey RJ, Kalluri HS. Ischemia-induced neurogenesis: role of growth factors. *Neurosurg Clin N Am*. 2007; Jan;18(1):183-190
- Denes A, Thornton P, Rothwell NJ, Allan SM. Inflammation and brain injury: acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation. *Brain Behav Immun* 2010; 24: 708–723
- Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Golland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*. 2008; 321:1218–1221
- Ding J, Cheng Y, Gao S, Chen J. Effects of nerve growth factor and Noggin-modified bone marrow stromal cells on stroke in rats. *J Neurosci Res*. 2011 Feb;89(2):222-2230

- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*. 1997 Jul 1;17(13):5046-5061
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; Sep 28;96(20):11619-11624
- Domańska-Janik K. Perspektywy zastosowania terapeutycznego komórek macierzystych w chorobach centralnego układu nerwowego. *Nauka* 2004; 2:17-26
- Domanska-Janik K, Habich A, Sarnowska A, Janowski M. Neural commitment of cord blood stem cells (HUCB-NSC/NP): therapeutic perspectives. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2006;66(4):279-291
- Dong Y, Benveniste EN Immune function of astrocytes. *Glia*. 2001 Nov;36(2):180-190
- Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*. 2003 Nov;24(24):4337-4351
- Eckert B. Acute Stroke Therapy 1981-2009. *Clinical Neuroradiology-Klinische Neuroradiologie* 2009; 19:8-19
- Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Rütther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Sirén AL. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002; 8:495–505
- Ehrenreich H, Timner W, Sirén AL. A novel role for an established player: anemia drug erythropoietin for the treatment of cerebral hypoxia/ischemia. *Transfus Apher Sci*. 2004 Aug;31(1):39-44
- Eid T, Brines ML, Cerami A, Spencer DD, Kim JH, Schweitzer JS, Ottersen OP, de Lanerolle NC. Increased expression of erythropoietin receptor on blood vessels in the human epileptogenic hippocampus with sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004 Jan;63(1):73-83
- Ekdahl CT, Claasen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; Nov 11;100(23):13632-13637
- Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience* 2009; 158: 1021–1029
- Ekonomou A, Johnson M, Perry RH, Perry EK, Kalaria RN, Minger SL, Ballard CG. Increased neural progenitors in individuals with cerebral small vessel disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2012 Jun;38(4):344-353
- Emerich DF, Dean RL 3rd, Bartus RT The role of leukocytes following cerebral ischemia: pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct? *Exp Neurol*. 2002 Jan;173(1):168-181
- Emsley HC, Smith CJ, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, Hallenbeck JM, del Zoppo GJ, Rothwell NJ, Tyrrell PJ, Hopkins SJ An early and sustained peripheral inflammatory response in acute ischaemic stroke: relationships with infection and atherosclerosis. *J Neuroimmunol*. 2003 Jun;139(1-2):93-101
- Emsley JG, Hagg T. Endogenous and exogenous ciliary neurotrophic factor enhances forebrain neurogenesis in adult mice. *Exp Neurol*. 2003 Oct;183(2):298-310
- Endoh M, Pulsinelli WA, Wagner JA. Transient global ischemia induces dynamic changes in the expression of bFGF and the FGF receptor. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994; Mar;22(1-4):76-88
- Erdö F, Bührle C, Blunk J, Hoehn M, Xia Y, Fleischmann B, Föcking M, Küstermann E, Kolossov E, Hescheler J, Hossmann KA, Trapp T. Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003 Jul;23(7):780-785

- Ergul A, Alhusban A, Fagan SC. Angiogenesis: a harmonized target for recovery after stroke. *Stroke*. 2012 Aug;43(8):2270-2274
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 1998 Nov;4(11):1313-1317
- Espinoza-Rojo M, Iturralde-Rodríguez KI, Cháñez-Cárdenas ME, Ruiz-Tachiquín ME, Aguilera P. Glucose transporters regulation on ischemic brain: Possible role of therapeutic target. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 2010; Dec 1;10(4):317-325
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 Jul 9;292(5819):154-156
- Fan CG, Zhang QJ, Tang FW, Han ZB, Wang GS, Han ZC. Human umbilical cord blood cells express neurotrophic factors. *Neurosci Lett*. 2005 Jun 3;380(3):322-325
- Fan L, Young PR, Barone FC, Feuerstein GZ, Smith DH, McIntosh TK. Experimental brain injury induces expression of interleukin-1 beta mRNA in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1995; 30: 125–130
- Feeney CJ and Stys PK. Astrocyte: Response to injury. *Encyclopedia of Neuroscience* 2009; 587-593 DOI 10.1016/B978-008045046-9.00998-0
- Feigin VL. Stroke epidemiology in the developing world *Lancet*. 2005; Jun 25 - Jul 1;365(9478):2160-2161
- Ferrer I, Krupinski J, Goutan E, Martí E, Ambrosio S, Arenas E. Brain-derived neurotrophic factor reduces cortical cell death by ischemia after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Acta Neuropathol*. 2001 Mar;101(3):229-238
- Figiel I. Pro-inflammatory cytokine TNF-alpha as a neuroprotective agent in the brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2008; 68: 526–534
- Finsen BR, Sørensen T, Castellano B, Pedersen EB, Zimmer J. Leukocyte infiltration and glial reactions in xenografts of mouse brain tissue undergoing rejection in the adult rat brain: a light and electron microscopical immunocytochemical study. *J Neuroimmunol* 1991; 32:159–183
- Fowlkes JL, Serra DM, Bunn RC, Thrailkill KM, Enghild JJ, Nagase H. Regulation of insulin-like growth factor (IGF)-I action by matrix metalloproteinase-3 involves selective disruption of IGF-I/IGF-binding protein-3 complexes. *Endocrinology*. 2004 Feb;145(2):620-626
- Frey JL. Recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) for stroke – The perspective at 8 years. *Neurologist* 2005; 11:123-33
- Friedrich MA, Martins MP, Araújo MD, Klamt C, Vedolin L, Garicochea B, Raupp EF, Sartori El Ammar J, Machado DC, Costa JC, Nogueira RG, Rosado-de-Castro PH, Mendez-Otero R, Freitas GR. Intra-arterial infusion of autologous bone marrow mononuclear cells in patients with moderate to severe middle cerebral artery acute ischemic stroke. *Cell Transplant*. 2012;21 Suppl 1:S13-21
- Frielingsdorf H, Simpson DR, Thal LJ, Pizzo DP. Nerve growth factor promotes survival of new neurons in the adult hippocampus. *Neurobiol Dis*. 2007 Apr;26(1):47-55
- Furuya K, Takeda H, Azhar S, McCarron RM, Chen Y, Ruetzler CA, Wolcott KM, DeGraba TJ, Rothlein R, Hugli TE, del Zoppo GJ, Hallenbeck JM. Examination of several potential mechanisms for the negative outcome in a clinical stroke trial of enlimomab, a murine anti-human intercellular adhesion molecule-1 antibody - A bedside-to-bench study. *Stroke* 2001; 32:2665-2674
- Galea I, Bernardes-Silva M, Forse PA, van Rooijen N, Liblau RS, Perry VH. An antigen-specific pathway for CD8 T cells across the blood-brain barrier. *J. Exp. Med*. 2007; 204, 2023–2030
- Galvão RP, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Brain-derived neurotrophic factor signaling does not stimulate subventricular zone neurogenesis in adult mice and rats. *J Neurosci*. 2008 Dec 10;28(50):13368-13383

- Gary DS, Bruce-Keller AJ, Kindy MS, Mattson MP. Ischemic and excitotoxic brain injury is enhanced in mice lacking the p55 tumor necrosis factor receptor. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 1283–1287
- Gasque P, Dean YD, McGreal EP, VanBeek J, Morgan BP. Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS. *Immunopharmacology*. 2000 Aug;49(1-2):171-186
- Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*. 1989 Oct 26;321(17):1174-1178
- Gluckman P, Klempt N, Guan J, Mallard C, Sirimanne E, Dragunow M, Klempt M, Singh K, Williams C, Nikolics K. A role for IGF-1 in the rescue of CNS neurons following hypoxic-ischemic injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992; Jan 31;182(2):593-599
- Gong C, Qin Z, Betz AL, Liu XH, Yang GY Cellular localization of tumor necrosis factor alpha following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res*. 1998 Aug 10;801(1-2):1-8
- Gore A, Li Z, Fung HL, Young JE, Agarwal S, Antosiewicz-Bourget J, Canto I, Giorgetti A, Israel MA, Kiskinis E, Lee JH, Loh YH, Manos PD, Montserrat N, Panopoulos AD, Ruiz S, Wilbert ML, Yu J, Kirkness EF, Izpisua Belmonte JC, Rossi DJ, Thomson JA, Eggan K, Daley GQ, Goldstein LS, Zhang K. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011 Mar 3;471(7336):63-67
- Gornicka-Pawlak E, Janowski M, Habich A, Jablonska A, Dreła K, Kozłowska H, Lukomska B, Sypecka J, Domanska-Janik K. Systemic treatment of focal brain injury in the rat by human umbilical cord blood cells being at different level of neural commitment. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2011; 71(1):46-64
- Goussev AV, Zhang ZG, Anderson DC, Chopp M. P-selectin antibody reduces hemorrhage and infarct volume resulting from MCA occlusion in the rat. *Journal of the Neurological Sciences* 1998; 161:16-22
- Greenberg DA, Jin K. Growth factors and stroke. *NeuroRx*. 2006 Oct;3(4):458-465
- Grilli M, Barbieri I, Basudev H, Brusa R, Casati C, Lozza G, Ongini E. Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischaemic damage. *Eur J Neurosci* 2000; 12: 2265–2272
- Guan J, Williams CE, Skinner SJ, Mallard EC, Gluckman PD. The effects of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-2, and des-IGF-1 on neuronal loss after hypoxic-ischemic brain injury in adult rats: evidence for a role for IGF binding proteins. *Endocrinology*. 1996 Mar;137(3):893-898
- Guan J, Bennet L, George S, Wu D, Waldvogel HJ, Gluckman PD, Faull RL, Crosier PS, Gunn AJ. Insulin-like growth factor-1 reduces postischemic white matter injury in fetal sheep. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001; May 21(5):493-502
- Guégan C, Onténiente B, Makiura Y, Merad-Boudia M, Ceballos-Picot I, Sola B. Reduction of cortical infarction and impairment of apoptosis in NGF-transgenic mice subjected to permanent focal ischemia. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998 Mar 30;55(1):133-140
- Guzman R, Choi R, Gera A, De Los Angeles A, Andres RH, Steinberg GK. Intravascular cell replacement therapy for stroke. *Neurosurg Focus*. 2008;24(3-4):E15
- Haas S, Weidner N, Winkler J. Adult stem cell therapy in stroke. *Curr Opin Neurol*. 2005 Feb;18(1):59-64
- Håberg A, Qu H, Saether O, Unsgård G, Haraldseth O, Sonnewald U. Differences in neurotransmitter synthesis and intermediary metabolism between glutamatergic and GABAergic neurons during 4 hours of middle cerebral artery occlusion in the rat: the role of astrocytes in neuronal survival. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001 Dec;21(12):1451-1463
- Habich A, Jurga M, Markiewicz I, Lukomska B, Bany-Laszewicz U, Domanska-Janik K. Early appearance of stem/progenitor cells with neural-like characteristics in human cord blood mononuclear fraction cultured in vitro. *Exp Hematol* 2006; 34: 914–925

- Habich A, Domanska-Janik K. Aggregation-promoted expansion of neurally committed human umbilical cord blood progenitors in vitro. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2011;71(1):1-11
- Hakim AM, Pokrupa RP, Villanueva J, Diksic M, Evans AC, Thompson CJ, Meyer E, Yamamoto YL, Feindel WH. The effect of spontaneous reperfusion on metabolic function in early human cerebral infarcts. *Ann Neurol*. 1987 Mar;21(3):279-89
- Hankey GJ. Potential new risk factors for ischemic stroke: what is their potential? *Stroke*. 2006; Aug;37(8):2181-2188
- Hayashi J, Takagi Y, Fukuda H, Imazato T, Nishimura M, Fujimoto M, Takahashi J, Hashimoto N, Nozaki K. Primate embryonic stem cell-derived neuronal progenitors transplanted into ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006; 26(7):906-914
- Hayashi T, Noshita N, Sugawara T, Chan PH. Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003 Feb;23(2):166-180
- Hayashi Y, Shumsky JS, Connors T, Otsuka T, Fischer I, Tessler A, Murray M. Immunosuppression with either cyclosporine a or FK506 supports survival of transplanted fibroblasts and promotes growth of host axons into the transplant after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2005 Nov;22(11):1267-1281
- Heiss WD The ischemic penumbra: how does tissue injury evolve? *Ann N Y Acad Sci*. 2012; Sep;1268(1):26-34
- Hermann DM, Kilic E, Kügler S, Isenmann S, Bähr M. Adenovirus-mediated GDNF and CNTF pretreatment protects against striatal injury following transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Neurobiol Dis*. 2001 Aug;8(4):655-666
- Hermann DM, Zechariah A. Implications of vascular endothelial growth factor for postischemic neurovascular remodeling. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009 Oct;29(10):1620-1643
- Hicks AU, Hewlett K, Windle V, Chernenko G, Ploughman M, Jolkonen J, Weiss S, Corbett D. Enriched environment enhances transplanted subventricular zone stem cell migration and functional recovery after stroke. *Neuroscience*. 2007 Apr 25;146(1):31-40
- Hicks AU, Lappalainen RS, Narkilahti S, Suuronen R, Corbett D, Sivenius J, Hovatta O, Jolkonen J. Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural precursor cells and enriched environment after cortical stroke in rats: cell survival and functional recovery. *Eur J Neurosci*. 2009 Feb;29(3):562-574
- Hoehn M, Küstermann E, Blunk J, Wiedermann D, Trapp T, Wecker S, Föcking M, Arnold H, Hescheler J, Fleischmann BK, Schwandt W, Bührle C. Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 10;99(25):16267-16272
- Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol* 2006; 66: 232–245
- Hurelbrink CB, Armstrong RJ, Dunnett SB, Rosser AE, Barker RA. Neural cells from primary human striatal xenografts migrate extensively in the adult rat CNS. *Eur J Neurosci* 2002; 15:1255–1266
- Hurn PD, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Kaler LJ, Vandenbark AA, Offner H T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007 Nov;27(11):1798-1805
- Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*. 2011 Jul 7;17(7):796-808
- Imitola J, Raddassi K, Park KI, Mueller FJ, Nieto M, Teng YD, Frenkel D, Li J, Sidman RL, Walsh CA, Snyder EY, Khoury SJ. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101:18117–18122

- Inzitari D, Poggesi A. Calcium channel blockers and stroke. *Aging Clin Exp Res* 2005; 17:16-30
- Iwai M, Sato K, Omori N, Nagano I, Manabe Y, Shoji M, Abe K. Three steps of neural stem cells development in gerbil dentate gyrus after transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002 Apr;22(4):411-419
- Iwashita A, Maemoto T, Nakada H, Shima I, Matsuoka N, Hisajima H. A novel potent radical scavenger, 8-(4-fluorophenyl)-2-((2E)-3-phenyl-2-propenoyl)-1,2,3,4-tetrahydropyrazolo[5,1-c][1,2,4]triazine (FR210575), prevents neuronal cell death in cultured primary neurons and attenuates brain injury after focal ischemia in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2003; 307:961-968
- Jaffer H, Morris VB, Stewart D, Labhasetwar V *Advances in Stroke Therapy. Drug Deliv Transl Res.* 2011 Dec 1;1(6):409-419
- Janowski M, Gornicka-Pawlak E, Kozłowska H, Domanska-Janik K, Gielecki J, Lukomska B. Structural and functional characteristic of a model for deep-seated lacunar infarct in rats. *J Neurol Sci.* 2008; Oct 15;273(1-2):40-48
- Janowski M, Lukomska B, Domanska-Janik K. Migratory capabilities of human umbilical cord blood-derived neural stem cells (HUCB-NSC) in vitro. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2011;71(1):24-35
- Jeong SW, Chu K, Jung KH, Kim SU, Kim M, Roh JK. Human neural stem cell transplantation promotes functional recovery in rats with experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke.* 2003 Sep;34(9):2258-2263
- Jiang L, Newman M, Saporta S, Chen N, Sanberg C, Sanberg PR, Willing AE. MIP-1alpha and MCP-1 Induce Migration of Human Umbilical Cord Blood Cells in Models of Stroke. *Curr Neurovasc Res.* 2008 May;5(2):118-124
- Jiang Q, Zhang ZG, Ding GL, Zhang L, Ewing JR, Wang L, Zhang R, Li L, Lu M, Meng H, Arbab AS, Hu J, Li QJ, Pourabdollah Nejad D S, Athiraman H, Chopp M. Investigation of neural progenitor cell induced angiogenesis after embolic stroke in rat using MRI. *Neuroimage.* 2005 Nov 15;28(3):698-707
- Jiao L, Zhang Y, Hu C, Wang YG, Huang A, He C. Rap1GAP interacts with RET and suppresses GDNF-induced neurite outgrowth. *Cell Res.* 2011; Feb;21(2):327-337
- Jin K, Minami M, Lan JQ, Mao XO, Bateur S, Simon RP, Greenberg DA. Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Apr 10;98(8):4710-4715
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; Sep 3;99(18):11946-11950
- Jin K, Wang X, Xie L, Mao XO, Zhu W, Wang Y, Shen J, Mao Y, Banwait S, Greenberg DA. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Aug 29;103(35):13198-13202
- Johnston BM, Mallard EC, Williams CE, Gluckman PD. Insulin-like growth factor-1 is a potent neuronal rescue agent after hypoxic-ischemic injury in fetal lambs. *J Clin Invest.* 1996 Jan 15;97(2):300-308
- Jurga M, Markiewicz I, Sarnowska A, Habich A, Kozłowska H, Lukomska B, Bużańska L, Domańska-Janik K. Neurogenic potential of human umbilical cord blood: neural-like stem cells depend on previous long-term culture conditions. *J Neurosci Res.* 2006; 83(4):627-637
- Jurga M, Lipkowski A, Lukomska B, Buzanska L, Kurzepa K, Sobanski T, Gajkowska B, Domanska-Janik K. Generation of functional neural artificial tissue from human umbilical-cord blood stem cells *Tissue Engineering* 2009; 15:365-372
- Kadoyama K, Funakoshi H, Ohya W, Nakamura T. Hepatocyte growth factor (HGF) attenuates gliosis and motoneuronal degeneration in the brainstem motor nuclei of a transgenic mouse model of ALS. *Neurosci Res.* 2007 Dec;59(4):446-456



- Kalluri HS, Dempsey RJ. Growth factors, stem cells, and stroke. *Neurosurg Focus*. 2008; 24(3-4):E14
- Kalluri HS, Vemuganti R, Dempsey RJ. Mechanism of insulin-like growth factor I-mediated proliferation of adult neural progenitor cells, role of Akt. *Eur J Neurosci*. 2007; Feb;25(4):1041-1048
- Kam M, Curtis MA, McGlashan SR, Connor B, Nannmark U, Faull RL. The cellular composition and morphological organization of the rostral migratory stream in the adult human brain. *J Chem Neuroanat*. 2009 May;37(3):196-205
- Kameda M, Shingo T, Takahashi K, Muraoka K, Kurozumi K, Yasuhara T, Maruo T, Tsuboi T, Uozumi T, Matsui T, Miyoshi Y, Hamada H, Date I. Adult neural stem and progenitor cells modified to secrete GDNF can protect, migrate and integrate after intracerebral transplantation in rats with transient forebrain ischemia. *Eur J Neurosci*. 2007 Sep;26(6):1462-1478
- Kaneko N, Sawamoto K. Adult neurogenesis and its alteration under pathological conditions. *Neurosci Res*. 2009 Mar;63(3):155-164
- Kang SS, Keasey MP, Arnold SA, Reid R, Gerald J, Hagg T. Endogenous CNTF mediates stroke-induced adult CNS neurogenesis in mice. *Neurobiol Dis*. 2012 Aug 31;49C:68-78
- Kaushansky K. Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med* 2006; 354:2034 –2045
- Kawai H, Yamashita T, Ohta Y, Deguchi K, Nagotani S, Zhang X, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K. Tridermal tumorigenesis of induced pluripotent stem cells transplanted in ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010; 30:1487–1493
- Kawai T, Takagi N, Miyake-Takagi K, Okuyama N, Mochizuki N, Takeo S. Characterization of BrdU-positive neurons induced by transient global ischemia in adult hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004; May;24(5):548-555
- Kawamata T, Dietrich WD, Schallert T, Gotts JE, Cocke RR, Benowitz LI, Finklestein SP. Intracisternal basic fibroblast growth factor (bFGF) enhances functional recovery and upregulates the expression of a molecular marker of neuronal sprouting following focal cerebral infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:8179–8184
- Kelly S, Bliss TM, Shah AK, Sun GH, Ma M, Foo WC, Masel J, Yenari MA, Weissman IL, Uchida N, Palmer T, Steinberg GK. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(32):11839-11844
- Kelly CM, Precious SV, Scherf C, Penketh R, Amso NN, Battersby A, Allen ND, Dunnett SB, Rosser AE. Neonatal desensitization allows long-term survival of neural xenotransplants without immunosuppression. *Nat Methods*. 2009; Apr;6(4):271-273
- Kermer P, Klocker N, Bahr M. Neuronal death after brain injury - Models, mechanisms, and therapeutic strategies in vivo. *Cell and Tissue Research* 1999; 298:383-395
- Kim JM, Lee ST, Chu K, Jung KH, Song EC, Kim SJ, Sinn DI, Kim JH, Park DK, Kang KM, Hyung Hong N, Park HK, Won CH, Kim KH, Kim M, Kun Lee S, Roh JK. Systemic transplantation of human adipose stem cells attenuated cerebral inflammation and degeneration in a hemorrhagic stroke model. *Brain Res*. 2007 Dec 5;1183:43-50
- Kita T, Liu L, Tanaka N, Kinoshita Y. The expression of tumor necrosis factor-alpha in the rat brain after fluid percussive injury. *Int J Legal Med* 1997; 110: 305–311
- Kitagawa H, Sasaki C, Zhang WR, Sakai K, Shiro Y, Warita H, Mitsumoto Y, Mori T, Abe K. Induction of glial cell line-derived neurotrophic factor receptor proteins in cerebral cortex and striatum after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res*. 1999; Jul 10;834(1-2):190-195

- Kitamura Y, Takata K, Inden M, Tsuchiya D, Yanagisawa D, Nakata J, Taniguchi T. Intracerebroventricular injection of microglia protects against focal brain ischemia. *J Pharmacol Sci.* 2004 Feb;94(2):203-206
- Knoepfler PS. Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells.* 2009; 27:1050–1056
- Koch F, Stanzl U, Jennewein P, Janke K, Heufler C, Kämpgen E, Romani N, Schuler G. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med* 1997; 184: 741–746
- Koenigsnecht J, Landreth G. Microglial phagocytosis of fibrillar beta-amyloid through a beta1 integrin-dependent mechanism. *J Neurosci* 2004; 24: 9838–9846
- Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Müller HW, Zanjani E, Wernet P. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004; 200: 123–135
- Koizumi H, Higginbotham H, Poon T, Tanaka T, Brinkman BC, Gleeson JG. Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain. *Nat Neurosci* 2006, 9: 779–786
- Kokaia Z, Zhao Q, Kokaia M, Elmér E, Metsis M, Smith ML, Siesjö BK, Lindvall O. Regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion with and without brain damage. *Exp Neurol.* 1995; Nov;136(1):73-88
- Koketsu D, Furuichi Y, Maeda M, Matsuoka N, Miyamoto Y, Hisatsune T. Increased number of new neurons in the olfactory bulb and hippocampus of adult non-human primates after focal ischemia. *Exp Neurol.* 2006; May;199(1):92-102
- Kokoeva MV, Yin H, Flier JS. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science.* 2005 Oct 28;310(5748):679-683
- Kondziolka D, Wechsler L, Goldstein S, Meltzer C, Thulborn KR, Gebel J, Jannetta P, DeCesare S, Elder EM, McGrogan M, Reitman MA, Bynum L. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology.* 2000 Aug 22;55(4):565-569
- Kondziolka D, Steinberg GK, Wechsler L, Meltzer CC, Elder E, Gebel J, Decesare S, Jovin T, Zafonte R, Lebowitz J, Flickinger JC, Tong D, Marks MP, Jamieson C, Luu D, Bell-Stephens T, Teraoka J. Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial. *J Neurosurg.* 2005 Jul;103(1):38-45
- Kozłowska H, Jabłonka J, Janowski M, Jurga M, Kossut M, Domańska-Janik K. Transplantation of a novel human cord blood-derived neural-like stem cell line in a rat model of cortical infarct. *Stem Cells Dev* 2007; 16: 481–488
- Krams M, Lees KR, Hacke W, Grieve AP, Orgogozo JM, Ford GA. Acute Stroke Therapy by Inhibition of Neutrophils (ASTIN) - An adaptive doseresponse study of UK-279,276 in acute ischemic stroke. *Stroke* 2003; 34:2543-2548
- Krupinski J, Issa R, Bujny T, Slevin M, Kumar P, Kumar S, Kaluza J. A putative role for platelet-derived growth factor in angiogenesis and neuroprotection after ischemic stroke in humans. *Stroke.* 1997 Mar;28(3):564-573
- Kuh SU, Cho YE, Yoon DH, Kim KN, Ha Y. Functional recovery after human umbilical cord blood cells transplantation with brain-derived neurotrophic factor into the spinal cord injured rat. *Acta Neurochir (Wien).* 2005 Sep;147(9):985-992
- Kuhn HG, Winkler J, Kempermann G, Thal LJ, Gage FH. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J Neurosci.* 1997 Aug 1;17(15):5820-5829

- Kunz A, Dirnagl U, Mergenthaler P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2010 Dec;24(4):495-509
- Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, Kawano Y, Ishii K, Kobune M, Hirai S, Uchida H, Sasaki K, Ito Y, Kato K, Honmou O, Houkin K, Date I, Hamada H. Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. *Mol Ther.* 2005 Jan;11(1):96-104
- Kwon MJ, Boo SH, Kim HJ, Cho YS, Chung WH, Hong SH A novel splice site mutation in the EYA1 gene in a Korean family with branchio-oto (BO) syndrome. *Acta Otolaryngol.* 2009 Jun;129(6):688-693
- Ladeby R, Wirenfeldt M, Garcia-Ovejero D, Fenger C, Dissing-Olesen L, Dalmau I, Finsen B Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005 Apr;48(2):196-206
- Lalancette-Hébert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci.* 2007 Mar 7;27(10):2596-2605
- Lambertsen KL, Clausen BH, Babcock AA, Gregersen R, Fenger C, Nielsen HH, Haugaard LS, Wirenfeldt M, Nielsen M, Dagnaes-Hansen F, Bluethmann H, Faergeman NJ, Meldgaard M, Deierborg T, Finsen B. Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. *J Neurosci* 2009; 29: 1319–1330
- Lanfranconi S, Locatelli F, Corti S, Candelise L, Comi GP, Baron PL, Strazzer S, Bresolin N, Bersano A. Growth factors in ischemic stroke. *J Cell Mol Med.* 2011 Aug;15(8):1645-1687
- Larsson E, Nanobashvili A, Kokaia Z, Lindvall O. Evidence for neuroprotective effects of endogenous brain-derived neurotrophic factor after global forebrain ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999; Nov;19(11):1220-1228
- Larsson LC, Widner H. Neural tissue xenografting. *Scand J Immunol.* 2000 Sep;52(3):249-256
- Larsson LC, Frielingsdorf H, Mirza B, Hansson SJ, Anderson P, Czech KA, Strandberg M, Widner H. Porcine neural xenografts in rats and mice: donor tissue development and characteristics of rejection. *Exp Neurol* 2001; 172:100–114
- Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I, Tran H, Schork A, Morey R, Lynch C, Harness JV, Lee S, Barrero MJ, Ku S, Martynova M, Semechkin R, Galat V, Gottesfeld J, Izpisua Belmonte JC, Murry C, Keirstead HS, Park HS, Schmidt U, Laslett AL, Muller FJ, Nievergelt CM, Shamir R, Loring JF. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell.* 2011 Jan 7;8(1):106-118
- Łazarewicz JW, Salińska E, Stafiej A, Ziembowicz A, Ziemińska E NMDA receptors and nitric oxide regulate prostaglandin D2 synthesis in the rabbit hippocampus in vivo. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2000; 60(4):427-435
- Le Belle JE, Caldwell MA, Svendsen CN. Improving the survival of human CNS precursor-derived neurons after transplantation. *J Neurosci Res* 2004; 76: 174–183
- Lee JS, Hong JM, Moon GJ, Lee PH, Ahn YH, Bang OY A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells.* 2010 Jun;28(6):1099-1106
- Lee SR, Kim HY, Rogowska J, Zhao BQ, Bhide P, Parent JM, Lo EH. Involvement of matrix metalloproteinase in neuroblast cell migration from the subventricular zone after stroke. *J Neurosci* 2006; 26(13):3491-3495
- Lee ST, Chu K, Jung KH, Kim SJ, Kim DH, Kang KM, Hong NH, Kim JH, Ban JJ, Park HK, Kim SU, Park CG, Lee SK, Kim M, Roh JK. Anti-inflammatory mechanism of intravascular neural stem cell transplantation in haemorrhagic stroke. *Brain.* 2008 Mar;131(Pt 3):616-629

- Leeb C, Jurga M, McGuckin C, Moriggl R, Kenner L. Promising new sources for pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev.* 2010 Mar;6(1):15-26
- Lees KR, Zivin JA, Ashwood T, Davalos A, Davis SM, Diener H, Grotta J, Lyden P, Shuaib A, Hardemark H, Wasiewski WW. NXY-059 for acute ischemic stroke. *New England Journal of Medicine* 2006; 354:588-600
- Lefer AM, Ma XL, Weyrich AS, Scalia R. Mechanism of the cardioprotective effect of transforming growth factor beta 1 in feline myocardial ischemia and reperfusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Feb 1;90(3):1018-1022
- Legos JJ, Tuma RF, Barone FC: Pharmacological interventions for stroke: failures and future. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2002, 11:603-614
- Legos JJ, Barone FC Update on pharmacological strategies for stroke: prevention, acute intervention and regeneration. *Curr Opin Investig Drugs* 2003, 4:847-58
- Leibinger M, Müller A, Andreadaki A, Hauk TG, Kirsch M, Fischer D. Neuroprotective and axon growth-promoting effects following inflammatory stimulation on mature retinal ganglion cells in mice depend on ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor. *J Neurosci.* 2009; Nov 11;29(45):14334-14341
- Leker RR, Soldner F, Velasco I, Gavin DK, Androutsellis-Theotokis A, McKay RD Long-lasting regeneration after ischemia in the cerebral cortex. *Stroke.* 2007 Jan;38(1):153-161
- Leventhal C, Rafii S, Rafii D, Shahar A, Goldman SA. Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. *Mol Cell Neurosci.* 1999 Jun;13(6):450-464
- Lewczuk P, Hasselblatt M, Kamrowski-Kruck H, Heyer A, Unzicker C, Sirén AL, Ehrenreich H. Survival of hippocampal neurons in culture upon hypoxia: effect of erythropoietin. *Neuroreport.* 2000 Nov 9;11(16):3485-3488
- Li L, Jiang Q, Zhang L, Ding G, Wang L, Zhang R, Zhang ZG, Li Q, Ewing JR, Kapke A, Lu M, Chopp M. Ischemic cerebral tissue response to subventricular zone cell transplantation measured by iterative self-organizing data analysis technique algorithm. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006 Nov;26(11):1366-1377
- Li QM, Fu YM, Shan ZY, Shen JL, Zhang XM, Lei L, Jin LH. MSCs guide neurite directional extension and promote oligodendrogenesis in NSCs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Jul 3;384(3):372-377
- Lichtenwalner RJ, Forbes ME, Sonntag WE, Riddle DR. Adult-onset deficiency in growth hormone and insulin-like growth factor-I decreases survival of dentate granule neurons: insights into the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci Res.* 2006 Feb 1;83(2):199-210
- Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2005 Jun;5(6):446-458
- Liman TG, Endres M. New vessels after stroke: postischemic neovascularization and regeneration. *Cerebrovasc Dis.* 2012;33(5):492-499
- Lin JH, Weigel H, Cotrina ML, Liu S, Bueno E, Hansen AJ, Hansen TW, Goldman S, Nedergaard M Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. *Nat Neurosci.* 1998 Oct;1(6):494-500
- Lin TN, Te J, Lee M, Sun GY, Hsu CY Induction of basic fibroblast growth factor bFGF expression following focal cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997 Oct 3;49(1-2):255-265
- Lin TN, Wang CK, Cheung WM, Hsu CY. Induction of angiopoietin and Tie receptor mRNA expression after cerebral ischemia-reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000 Feb;20(2):387-295
- Lindholm P, Voutilainen MH, Laurén J, Peränen J, Leppänen VM, Andressoo JO, Lindahl M, Janhunen S, Kalkkinen N, Timmusk T, Tuominen RK, Saarna M. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. *Nature.* 2007 Jul 5;448(7149):73-77
- Lindvall O, Kokaia Z. Stem cell therapy for human brain disorders. *Kidney Int.* 2005 Nov;68(5):1937-1939

- Lindvall O, Kokaia Z Stem cells in human neurodegenerative disorders--time for clinical translation? *J Clin Invest.* 2010 Jan;120(1):29-40
- Liu HY, Zhang QJ, Li HJ, Han ZC. Effect of intracranial transplantation of CD34+ cells derived from human umbilical cord blood in rats with cerebral ischemia. *Chin Med J (Engl).* 2006 Oct 20;119(20):1744-1748
- Liu J, Solway K, Messing RO, Sharp FR Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci.* 1998 Oct 1;18(19):7768-7778
- Liu P, Xu B, Spokas E, Lai PS, Wong PY. Role of endogenous nitric oxide in TNF-alpha and IL-1beta generation in hepatic ischemia-reperfusion Shock. 2000; 13: 217–223
- Liu Y, Teige I, Birnir B, Issazadeh-Navikas S. Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE. *Nat Med* 2006; 12: 518–525
- Liu YP, Lang BT, Baskaya MK, Dempsey RJ, Vemuganti R The potential of neural stem cells to repair stroke-induced brain damage. *Acta Neuropathol.* 2009 May;117(5):469-480
- Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci.* 2003 May;4(5):399-415
- Lo EH A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med.* 2008 May;14(5):497-500
- Lu KT, Wang YW, Wo YY, Yang YL. Extracellular signal-regulated kinase-mediated IL-1-induced cortical neuron damage during traumatic brain injury. *Neurosci Lett.* 2005 Sep 23;386(1):40-45
- Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* 2006; 147: S232–S240
- Lucin KM, Wyss-Coray T. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron.* 2009 Oct 15;64(1):110-122
- Macas J, Nern C, Plate KH, Momma S Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain. *J Neurosci.* 2006 Dec 13;26(50):13114-13119
- Mäkinen S, Kekarainen T, Nystedt J, Liimatainen T, Huhtala T, Närvänen A, Laine J, Jolkkonen J. Human umbilical cord blood cells do not improve sensorimotor or cognitive outcome following transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res.* 2006 Dec 6;1123(1):207-215
- Maltman DJ, Hardy SA, Przyborski SA. Role of mesenchymal stem cells in neurogenesis and nervous system repair. *Neurochem Int.* 2011 Sep;59(3):347-356
- Man Y, Li J, Yang B, Ma J. Vein transplantation using human umbilical cord blood stem cells in the treatment of stroke sequela. *Neural Regener Res* 2006;1:618–621
- Marciniak K, Butwicka A, Nowak JZ. PEDF: an endogenous factor displaying potent neuroprotective, neurotrophic, and antiangiogenic activity. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2006;60:387-396
- Markiewicz I, Lukomska B. The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2006;66(4):343-358
- Markiewicz I, Sypecka J, Domanska-Janik K, Wyszomirski T, Lukomska B. Cellular environment directs differentiation of human umbilical cord blood-derived neural stem cells in vitro. *J Histochem Cytochem.* 2011 Mar;59(3):289-301
- Marler JR, Goldstein LB. Medicine. Stroke-tPA and the clinic. *Science.* 2003; 301:1677

- Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E, Risau W. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol.* 2000 Mar;156(3):965-976
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981 Dec;78(12):7634-7638
- Matchett GA, Calinisan JB, Matchett GC, Martin RD, Zhang JH. The effect of granulocyte-colony stimulating factor in global cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 2007; 1136:200–207
- McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science.* 1997 Apr 4;276(5309):66-71
- McNeill H, Williams C, Guan J, Dragunow M, Lawlor P, Sirimanne E, Nikolics K, Gluckman P. Neuronal rescue with transforming growth factor-beta 1 after hypoxic-ischaemic brain injury. *Neuroreport.* 1994 Apr 14;5(8):901-904
- Meier C, Middelanis J, Wasielewski B, Neuhoﬀ S, Roth-Haerer A, Gantert M, Dinse HR, Dermietzel R, Jensen A. Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells. *Pediatr Res.* 2006 Feb;59(2):244-249
- Memezawa H, Smith ML, Siesjö BK. Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke.* 1992 Apr;23(4):552-559
- Metcalfe AD, Ferguson MW. Skin stem and progenitor cells: using regeneration as a tissue-engineering strategy. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Jan;65(1):24-32
- Mi R, Luo Y, Cai J, Limke TL, Rao MS, Höke A. Immortalized neural stem cells differ from nonimmortalized cortical neurospheres and cerebellar granule cell progenitors. *Exp Neurol.* 2005 Aug;194(2):301-319
- Michel DC, Nerrière-Daguin V, Josien R, Brachet P, Naveilhan P, Neveu I. Dendritic cell recruitment following xenografting of pig fetal mesencephalic cells into the rat brain. *Exp Neurol* 2006; 202:76–84
- Minami M, Satoh M. Chemokines as mediators for intercellular communication in the brain. *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 2000 Apr;115(4):193-200
- Minger SL, Ekonomou A, Carta EM, Chinoy A, Perry RH, Ballard CG. Endogenous neurogenesis in the human brain following cerebral infarction. *Regen Med.* 2007; Jan;2(1):69-74
- Mirza B, Krook H, Andersson P, Larsson LC, Korsgren O, Widner H. Intracerebral cytokine profiles in adult rats grafted with neural tissue of different immunological disparity. *Brain Res Bull.* 2004 Mar 15;63(2):105-118
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell.* 2008 Sep 11;3(3):265-278
- Molcanyi M, Riess P, Bentz K, Maegele M, Hescheler J, Schäfke B, Trapp T, Neugebauer E, Klug N, Schäfer U. Trauma-associated inflammatory response impairs embryonic stem cell survival and integration after implantation into injured rat brain. *J Neurotrauma.* 2007 Apr;24(4):625-637
- Moniche F, Gonzalez A, Gonzalez-Marcos JR, Carmona M, Piñero P, Espigado I, Garcia-Solis D, Cayuela A, Montaner J, Boada C, Rosell A, Jimenez MD, Mayol A, Gil-Peralta A. Intra-arterial bone marrow mononuclear cells in ischemic stroke: a pilot clinical trial. *Stroke.* 2012 Aug;43(8):2242-2244
- Mora-Lee S, Sirerol-Piquer MS, Gutiérrez-Pérez M, Gomez-Pinedo U, Roobrouck VD, López T, Casado-Nieto M, Abizanda G, Rabena MT, Verfaille C, Prósper F, García-Verdugo JM. Therapeutic Effects of hMAPC and hMSC Transplantation after Stroke in Mice. *PLoS One.* 2012;7(8):e43683. Epub 2012 Aug 31

- Mori E, del Zoppo GJ, Chambers JD, Copeland BR, Arfors KE Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppresses no-reflow after focal cerebral ischemia in baboons. *Stroke*. 1992 May;23(5):712-718
- Müller A, Hauk TG, Leibinger M, Marienfeld R, Fischer D. Exogenous CNTF stimulates axon regeneration of retinal ganglion cells partially via endogenous CNTF. *Mol Cell Neurosci*. 2009; Jun;41(2):233-246
- Müller S, Chakrapani BP, Schwegler H, Hofmann HD, Kirsch M. Neurogenesis in the dentate gyrus depends on ciliary neurotrophic factor and signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *Stem Cells*. 2009 Feb;27(2):431-441
- Muir KW, Tyrrell P, Sattar N, Warburton E Inflammation and ischaemic stroke. *Curr Opin Neurol*. 2007 Jun;20(3):334-342
- Muraoka K, Shingo T, Yasuhara T, Kameda M, Yuan W, Hayase H, Matsui T, Miyoshi Y, Date I. The high integration and differentiation potential of autologous neural stem cell transplantation compared with allogeneic transplantation in adult rat hippocampus. *Exp Neurol*. 2006 Jun;199(2):311-327
- Murdoch I, Perry EK, Court JA, Graham DI, Dewar D. Cortical cholinergic dysfunction after human head injury. *J Neurotrauma* 1998; 15: 295–305
- Murphey RK, Froggett SJ, Caruccio P, Shan-Crofts X, Kitamoto T, Godenschwege TA. Targeted expression of shibire ts and semaphorin 1a reveals critical periods for synapse formation in the giant fiber of *Drosophila*. *Development*. 2003; Aug;130(16):3671-3682
- Nakajima K, Kohsaka S. Microglia: neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2004; 4: 65–84
- Nakanishi H. Microglial functions and proteases. *Mol Neurobiol*. 2003 Apr;27(2):163-176
- Nawashiro H, Martin D, Hallenbeck JM. Neuroprotective effects of TNF binding protein in focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1997; 778: 265–271
- Nawashiro H, Brenner M, Fukui S, Shima K, Hallenbeck JM High susceptibility to cerebral ischemia in GFAP-null mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000 Jul;20(7):1040-1044
- Ninomiya M, Yamashita T, Araki N, Okano H, Sawamoto K Enhanced neurogenesis in the ischemic striatum following EGF-induced expansion of transit-amplifying cells in the subventricular zone. *Neurosci Lett*. 2006 403, 63–67
- Niranjana A, Fellows W, Stauffer W, Burton EA, Hong CS, Lunsford LD, Kondziolka D, Glorioso JC, Gobbel GT. Survival of transplanted neural progenitor cells enhanced by brain irradiation. *J Neurosurg*. 2007 Aug;107(2):383-391
- Norenberg MD, The Reactive Astrocyte. In *The Role of Glia In Neurotoxicity* CRC Press Boca Raton 2005 Washington DC, p.73-92
- Nygren J, Kokaia M, Wieloch T. Decreased expression of brain-derived neurotrophic factor in BDNF(+/-) mice is associated with enhanced recovery of motor performance and increased neuroblast number following experimental stroke. *J Neurosci Res*. 2006; Aug 15;84(3):626-631
- Nystedt J, Mäkinen S, Laine J, Jolkonen J. Human cord blood CD34+ cells and behavioral recovery following focal cerebral ischemia in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2006;66(4):293-300
- Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci*. 2006; 26: 13007–13016
- Okura Y, Tanaka R, Ono K, Yoshida S, Tanuma N, Matsumoto Y. Treatment of rat hemiparkinson model with xenogeneic neural transplantation: tolerance induction by anti-T-cell antibodies. *J Neurosci Res*. 1997 Jun 1;48(5):385-396

- Olstorn H, Moe MC, Røste GK, Bueters T, Langmoen IA. Transplantation of stem cells from the adult human brain to the adult rat brain. *Neurosurgery* 2007; 60: 1089–1098
- Ooboshi H, Ibayashi S, Shichita T, Kumai Y, Takada J, Ago T, Arakawa S, Sugimori H, Kamouchi M, Kitazono T, Iida M. Postischemic gene transfer of interleukin-10 protects against both focal and global brain ischemia. *Circulation* 2005; 111: 913–919
- Ou Y, Yu S, Kaneko Y, Tajiri N, Bae EC, Chheda SH, Stahl CE, Yang T, Fang L, Hu K, Borlongan CV, Yu G. Intravenous infusion of GDNF gene-modified human umbilical cord blood CD34+ cells protects against cerebral ischemic injury in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res.* 2010 Dec 17;1366:217-225
- Owens T, Bechmann I, Engelhardt B. Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67: 1113–1121
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *The Journal of comparative neurology* 2000; 425:479–494
- Pan Y, Nastav JB, Zhang H, Bretton RH, Panneton WM, Bicknese AR. Engraftment of freshly isolated or cultured human umbilical cord blood cells and the effect of cyclosporin A on the outcome. *Exp Neurol.* 2005 Apr;192(2):365-372
- Paratcha G, Ibáñez CF, Ledda F. GDNF is a chemoattractant factor for neuronal precursor cells in the rostral migratory stream. *Mol Cell Neurosci.* 2006 Mar;31(3):505-514
- Park DH, Borlongan CV, Willing AE, Eve DJ, Cruz LE, Sanberg CD, Chung YG, Sanberg PR. Human umbilical cord blood cell grafts for brain ischemia. *Cell Transplant.* 2009;18(9):985-998
- Pedersen EB, Zimmer J, Finsen B. Triple immunosuppression protects murine intracerebral, hippocampal xenografts in adult rat hosts: effects on cellular infiltration, major histocompatibility complex antigen induction and blood– brain barrier leakage. *Neuroscience* 1997;78(3):685–701
- Pereira AC, Huddleston DE, Brickman AM, Sosunov AA, Hen R, McKhann GM, Sloan R, Gage FH, Brown TR, Small SA. An in vivo correlate of exercise-induced neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 27;104(13):5638-5643
- Pickering M, Cumiskey D, O'Connor JJ. Actions of TNF-alpha on glutamatergic synaptic transmission in the central nervous system. *Exp Physiol* 2005; 90: 663–670
- Pimentel-Coelho PM, Magalhães ES, Lopes LM, deAzevedo LC, Santiago MF, Mendez-Otero R. Human cord blood transplantation in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage: functional outcome related to neuroprotection in the striatum. *Stem Cells Dev.* 2010 Mar;19(3):351-358
- Pitzer C, Klusmann S, Krüger C, Letellier E, Plaas C, Dittgen T, Kirsch F, Stieltjes B, Weber D, Laage R, Martin-Villalba A, Schneider A. The hematopoietic factor granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in experimental spinal cord injury. *J Neurochem.* 2010 May;113(4):930-942
- Pryce G, Baker D. Control of spasticity in a multiple sclerosis model is mediated by CB1, not CB2, cannabinoid receptors. *Br J Pharmacol* 2007; 150: 519–525
- Pulsinelli WA, Duffy TE. Regional energy balance in rat brain after transient forebrain ischemia. *J Neurochem.* 1983 May;40(5):1500-1503
- Rabinovich SS, Seledtsov VI, Banul NV, Poveshchenko OV, Senyukov VV, Astrakov SV, Samarin DM, Taraban VY. Cell therapy of brain stroke. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2005; 139: 126–128
- Rafałowska J. Experimental and human ischaemia: is the penumbra present in human ischaemic stroke? *Folia Neuropathol.* 2002;40(4):211-217
- Ramon y Cajal S. Degeneration and regeneration of the nervous system. In Ramon y Cajal S, ed. New York: Haffner Publishing; 1928



- Ransohoff RM, Perry VH Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:119-145
- Relton JK, Martin D, Thompson RC, Russell DA Peripheral administration of Interleukin-1 Receptor antagonist inhibits brain damage after focal cerebral ischemia in the rat. *Exp Neurol.* 1996 Apr;138(2):206-213
- Rémy S, Canova C, Daguin-Nerrière V, Martin C, Melchior B, Neveu I, Charreau B, Soullillou JP, Brachet P. Different mechanisms mediate the rejection of porcine neurons and endothelial cells transplanted into the rat brain. *Xenotransplantation* 2001; 8:136–148
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol.* 2000 Apr;18(4):399-404
- Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science.* 1992 Mar 27;255(5052):1707-1710
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 1997 Dec;20(12):570-577
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997 Apr 17;386(6626):671-674
- Rizk NN, Myatt-Jones J, Rafols J, Dunbar JC. Insulin like growth factor-1 (IGF-1) decreases ischemia-reperfusion induced apoptosis and necrosis in diabetic rats. *Endocrine.* 2007 Feb;31(1):66-71
- Robin AM, Zhang ZG, Wang L, Zhang RL, Katakowski M, Zhang L, Wang Y, Zhang C, Chopp M. Stromal cell-derived factor 1alpha mediates neural progenitor cell motility after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26:125–134
- Rock KL, Kono H. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol.* 2008;3:99-126
- Ronsyn MW, Daans J, Spaepen G, Chatterjee S, Vermeulen K, D'Haese P, Van Tendeloo VF, Van Marck E, Ysebaert D, Berneman ZN, Jorens PG, Ponsaerts P. Plasmid-based genetic modification of human bone marrow-derived stromal cells: analysis of cell survival and transgene expression after transplantation in rat spinal cord. *BMC Biotechnol.* 2007 Dec 14;7:90
- Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, Hernández-Guillamon M, Lo EH, Montaner J MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke.* 2008 Apr;39(4):1121-1126
- Rosenkranz K, Kumbruch S, Tenbusch M, Marcus K, Marschner K, Dermietzel R, Meier C. Transplantation of human umbilical cord blood cells mediated beneficial effects on apoptosis, angiogenesis and neuronal survival after hypoxic-ischemic brain injury in rats. *Cell Tissue Res.* 2012; 348(3):429-438
- Ross AM, Hurn P, Perrin N, Wood L, Carlini W, Potempa K Evidence of the peripheral inflammatory response in patients with transient ischemic attack. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2007 16(5):203-207
- Rothwell NJ. Cytokines - killers in the brain? *J Physiol* 1999; 514: 3–17
- Ruhul Amin AR, Senga T, Oo ML, Thant AA, Hamaguchi M. Secretion of matrix metalloproteinase-9 by the proinflammatory cytokine, IL-1beta: a role for the dual signaling pathways, Akt and Erk. *Genes Cells* 2003; 8: 515–523
- Ruocco A, Nicole O, Docagne F, Ali C, Chazalviel L, Komesli S, Yablonsky F, Roussel S, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A. A transforming growth factor-beta antagonist unmasks the neuroprotective role of this endogenous cytokine in excitotoxic and ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999 Dec;19(12):1345-1353
- Sahota P, Savitz SI. Investigational therapies for ischemic stroke: neuroprotection and neurorecovery. *Neurotherapeutics.* 2011 Jul;8(3):434-451

- Samoylenko A, Byts N, Rajalingam K, von Ahsen N, Rapp UR, Ehrenreich H, Sirén AL. Thrombopoietin inhibits nerve growth factor-induced neuronal differentiation and ERK signalling. *Cell Signal*. 2008 Jan;20(1):154-162
- Sanagi T, Yabe T, Yamada H. Gene transfer of PEDF attenuates ischemic brain damage in the rat middle cerebral artery occlusion model. *J Neurochem*. 2008 Aug;106(4):1841-1854
- Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-García Verdugo J, Berger MS, Alvarez-Buylla A. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*. 2004 Feb 19;427(6976):740-744
- Saver JL Time is brain--quantified. *Stroke*. 2006 Jan;37(1):263-266
- Savitz SI, Dinsmore J, Wu J, Henderson GV, Stieg P, Caplan LR. Neurotransplantation of fetal porcine cells in patients with basal ganglia infarcts: a preliminary safety and feasibility study. *Cerebrovasc Dis*. 2005;20(2):101-107
- Schäbitz WR, Hoffmann TT, Heiland S, Kollmar R, Bardutzky J, Sommer C, Schwab S. Delayed neuroprotective effect of insulin-like growth factor-i after experimental transient focal cerebral ischemia monitored with mri. *Stroke*. 2001 May;32(5):1226-1233
- Schäbitz WR, Kollmar R, Schwaninger M, Juettler E, Bardutzky J, Schölzke MN, Sommer C, Schwab S. Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke* 2003; 34:745–751
- Schäbitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, Schwab S, Sommer C, Schneider A, Kuhn HG Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke*. 2007 Jul;38(7):2165-2172
- Schilling M, Besselmann M, Leonhard C, Mueller M, Ringelstein EB, Kiefer R. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol* 2003; 183: 25–33
- Schmidt W, Reymann KG Proliferating cells differentiate into neurons in the hippocampal CA1 region of gerbils after global cerebral ischemia. *Neurosci Lett*. 2002 Dec 16;334(3):153-156
- Schneider A, Krüger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R, Aronowski J, Maurer MH, Gassler N, Mier W, Hasselblatt M, Kollmar R, Schwab S, Sommer C, Bach A, Kuhn HG, Schäbitz WR. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest* 2005; 115(8): 2083–2098
- Schroeter M, Jander S, Witte OW, Stoll G Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion. *J Neuroimmunol*. 1994 Dec;55(2):195-203
- Schurr A Neuroprotection-against ischemic/hypoxic brain damage: Blockers of ionotropic glutamate receptor and voltage sensitive calcium channels. *Current Drug Targets* 2004, 5:603-618
- Sehara Y, Hayashi T, Deguchi K, Zhang H, Tsuchiya A, Yamashita T, Lukic V, Nagai M, Kamiya T, Abe K. Decreased Focal Inflammatory Response by G-CSF May Improve Stroke Outcome After Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *J. Neurosci. Res*. 2007; 85, 2167–2174
- Selman WR, VanDerVeer C, Whittingham TS, LaManna JC, Lust WD, Ratcheson RA. Visually defined zones of focal ischemia in the rat brain. *Neurosurgery*. 1987 Dec;21(6):825-830
- Semenov DG, Samoilo MO, Lazarewicz JW Preconditioning reduces hypoxia-evoked alterations in glutamatergic Ca<sup>2+</sup> signaling in rat cortex. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2008;68(2):169-179
- Shang J, Deguchi K, Ohta Y, Liu N, Zhang X, Tian F, Yamashita T, Ikeda Y, Matsuura T, Funakoshi H, Nakamura T, Abe K. Strong neurogenesis, angiogenesis, synaptogenesis, and antifibrosis of hepatocyte

- growth factor in rats brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Res.* 2011; Jan 89(1):86-95
- Shang J, Deguchi K, Yamashita T, Ohta Y, Zhang H, Morimoto N, Liu N, Zhang X, Tian F, Matsuura T, Funakoshi H, Nakamura T, Abe K. Antiapoptotic and antiautophagic effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and hepatocyte growth factor after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Res.* 2010; Aug 1;88(10):2197-2206
  - Shen LH, Li Y, Chen J, Zacharek A, Gao Q, Kapke A, Lu M, Raginski K, Vanguri P, Smith A, Chopp M. Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007 Jan;27(1):6-13
  - Shen LH, Li Y, Chen J, Cui Y, Zhang C, Kapke A, Lu M, Savant-Bhonsale S, Chopp M. One-year follow-up after bone marrow stromal cell treatment in middle-aged female rats with stroke. *Stroke.* 2007 Jul;38(7):2150-2156
  - Shen LH, Li Y, Chopp M. Astrocytic endogenous glial cell derived neurotrophic factor production is enhanced by bone marrow stromal cell transplantation in the ischemic boundary zone after stroke in adult rats. *Glia.* 2010 Jul;58(9):1074-1081
  - Shen Q, Wang Y, Kokovay E, Lin G, Chuang SM, Goderie SK, Roysam B, Temple S. Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions. *Cell Stem Cell.* 2008 Sep 11;3(3):289-300
  - Shen Z, Mohiuddin M, Goldstein C, Yokoyama H, DiSesa VJ. Tolerance to experimental cardiac allografts but not xenografts is induced after simultaneous neonatal intrathymic inoculation with allo and xenogeneic cells. *Transplant Proc.* 1996 Apr;28(2):719-720
  - Shen Z, Pelletier S, Mohiuddin M, Yokoyama H, Reiss GR, DiSesa VJ. Different immune effects on cardiac allografts and xenografts induced by neonatal intrathymic inoculation with allogeneic and xenogeneic antigens. *J Heart Lung Transplant.* 1996 Oct;15(10):1034-1038
  - Shim JW, Park CH, Bae YC, Bae JY, Chung S, Chang MY, Koh HC, Lee HS, Hwang SJ, Lee KH, Lee YS, Choi CY, Lee SH. Generation of functional dopamine neurons from neural precursor cells isolated from the subventricular zone and white matter of the adult rat brain using Nurr1 overexpression. *Stem Cells.* 2007 May;25(5):1252-1262
  - Shin HY, Kim JH, Phi JH, Park CK, Kim JE, Kim JH, Paek SH, Wang KC, Kim DG. Endogenous neurogenesis and neovascularization in the neocortex of the rat after focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res.* 2008 Feb 1;86(2):356-367
  - Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, Diener H, Ashwood T, Wasiewski WW, Emeribe U. NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *New England Journal of Medicine* 2007, 357:562-571
  - Shyu WC, Lin SZ, Yang HI, Tzeng YS, Pang CY, Yen PS, Li H. Functional recovery of stroke rats induced by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated stem cells. *Circulation* 2004; 110, 1847–1854
  - Shyu WC, Lin SZ, Lee CC, Liu DD, Li H. Granulocyte colony-stimulating factor for acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *CMAJ* 2006; 174:927–933
  - Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg.* 1992 Aug;77(2):169-184
  - Sims NR, Muyderman H. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Jan;1802(1):80-91
  - Sinor AD, Greenberg DA. Erythropoietin protects cultured cortical neurons, but not astroglia, from hypoxia and AMPA toxicity. *Neurosci Lett.* 2000 Sep 1;290(3):213-215
  - Sirén AL, Fasshauer T, Bartels C, Ehrenreich H. Therapeutic potential of erythropoietin and its structural or functional variants in the nervous system. *Neurotherapeutics.* 2009 Jan;6(1):108-127

- Snapyan M, Lemasson M, Brill MS, Blais M, Massouh M, Ninkovic J, Gravel C, Berthod F, Götz M, Barker PA, Parent A, Saghatelian A. Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci*. 2009 Apr 1;29(13):4172-4188
- Somera-Molina KC, Nair S, Van Eldik LJ, Watterson DM, Wainwright MS. Enhanced microglial activation and proinflammatory cytokine upregulation are linked to increased susceptibility to seizures and neurologic injury in a 'two-hit' seizure model. *Brain Res* 2009; 1282: 162–172
- Spera PA, Ellison JA, Feuerstein GZ, Barone FC. IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke. *Neurosci Lett* 1998; 251: 189–192
- Sprigg N, Bath PM, Zhao L, Willmot MR, Gray LJ, Walker MF, Dennis MS, Russell N. Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes bone marrow stem cells in patients with subacute ischemic stroke: The stem cell trial of recovery enhancement after stroke (STEMS) pilot randomized, controlled trial. *Stroke* 2006; 37:2979–2983
- Stevens SL, Bao J, Hollis J, Lessov NS, Clark WM, Stenzel-Poore MP. The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res* 2002; 932: 110–119
- Stroemer P, Hope A, Patel S, Pollock K, Sinden J. Development of a human neural stem cell line for use in recovery from disability after stroke. *Front Biosci*. 2008 Jan 1;13:2290-2292
- Sun Y, Jin K, Childs JT, Xie L, Mao XO, Greenberg DA Neuronal nitric oxide synthase and ischemia-induced neurogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005 Apr;25(4):485-492
- Sun Y, Jin K, Childs JT, Xie L, Mao XO, Greenberg DA. Vascular endothelial growth factor-B (VEGFB) stimulates neurogenesis: evidence from knockout mice and growth factor administration. *Dev Biol*. 2006 Jan 15;289(2):329-335
- Sun ZP, Gong L, Huang SH, Geng Z, Cheng L, Chen ZY. Intracellular trafficking and secretion of cerebral dopamine neurotrophic factor in neurosecretory cells. *J Neurochem*. 2011 Apr;117(1):121-132
- Swijnenburg R, Schrepfer S, Govaert J, Cao F, Ransohoff K, Sheikh Y, Haddad M, Connolly A, Davis M, Robbins R, Wu J. Immunosuppressive therapy mitigates immunological rejection of human embryonic stem cell xenografts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 12991–12996
- Sydserff SG, Borelli AR, Green AR, Cross AJ: Effect of NXY-059 on infarct volume after transient or permanent middle cerebral artery occlusion in the rat; studies on dose, plasma concentration and therapeutic time window. *British Journal of Pharmacology* 2002, 135:103-112
- Symon L, Lassen NA, Astrup J, Branston NM. Thresholds of ischaemia in brain cortex. *Adv Exp Med Biol*. 1977 Jul 4-7;94:775-782
- Sypecka J, Sarnowska A, Domanska-Janik K. Crucial role of the local microenvironment in fate decision of neonatal rat NG2 progenitors. *Cell Proliferation* 2009; 42:661-667
- Szymczak P, Wojcik-Stanaszek L, Sypecka J, Sokolowska A, Zalewska T. Effect of matrix metalloproteinases inhibition on the proliferation and differentiation of HUCB-NSCs cultured in the presence of adhesive substrates. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2010; 70(4):325-336
- Tadimalla A, Belmont PJ, Thuerauf DJ, Glassy MS, Martindale JJ, Gude N, Sussman MA, Glembotski CC. Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor is an ischemia-inducible secreted endoplasmic reticulum stress response protein in the heart. *Circ Res* 2008;103:1249–1258
- Taguchi A, Wen Z, Myojin K, Yoshihara T, Nakagomi T, Nakayama D, Tanaka H, Soma T, Stern DM, Naritomi H, Matsuyama T. Granulocyte colony-stimulating factor has a negative effect on stroke outcome in a murine model. *Eur J Neurosci* 2007; 26:126–133
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126:663–676

- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861–872
- Takami K, Iwane M, Kiyota Y, Miyamoto M, Tsukuda R, Shiosaka S Increase of basic fibroblast growth factor immunoreactivity and its mRNA level in rat brain following transient forebrain ischemia. *Exp Brain Res.* 1992;90(1):1-10
- Tambuyzer BR, Bergwerf I, De Vocht N, Reekmans K, Daans J, Jorens PG, Goossens H, Ysebaert DK, Chatterjee S, Van Marck E, Berneman ZN, Ponsaerts P. Allogeneic stromal cell implantation in brain tissue leads to robust microglial activation. *Immunol Cell Biol.* 2009 May-Jun;87(4):267-273
- Tanaka R, Yamashiro K, Mochizuki H, Cho N, Onodera M, Mizuno Y, Urabe T. Neurogenesis after transient global ischemia in the adult hippocampus visualized by improved retroviral vector. *Stroke.* 2004 Jun;35(6):1454-1459
- Taoufik E, Probert L Ischemic neuronal damage. *Curr Curr Pharm Des.* 2008;14(33):3565-3573
- Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Wikkelso C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A. Early intrathecal production of interleukin-6 predicts the size of brain lesion in stroke. *Stroke.* 1995 Aug;26(8):1393-1398
- Taupin P. Adult neurogenesis, neuroinflammation and therapeutic potential of adult neural stem cells. *Int J Med Sci.* 2008 Jun 5;5(3):127-132
- Tavazoie M, Van der Veken L, Silva-Vargas V, Louissaint M, Colonna L, Zaidi B, Garcia-Verdugo JM, Doetsch F. A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008 Sep 11;3(3):279-288
- Teng H, Zhang ZG, Wang L, Zhang RL, Zhang L, Morris D, Gregg SR, Wu Z, Jiang A, Lu M, Zlokovic BV, Chopp M Coupling of angiogenesis and neurogenesis in cultured endothelial cells and neural progenitor cells after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008 Apr;28(4):764-771
- The FIBLAST Safety Study Group. Clinical safety of intravenous bFGF in acute stroke. *Stroke* 1998; 29:287
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998 Nov 6;282(5391):1145-1147
- Thored P, Arvidsson A, Cacci E, Ahlenius H, Kallur T, Darsalia V, Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells* 2006;24:739–747
- Thornton P, Pinteaux E, Allan SM, Rothwell NJ. Matrix metalloproteinase-9 and urokinase plasminogen activator mediate interleukin-1-induced neurotoxicity. *Mol Cell Neurosci* 2008; 37: 135–142
- Tian L, Rauvala H, Gahmberg CG. Neuronal regulation of immune responses in the central nervous system. *Trends Immunol* 2009; 30: 91–99
- Toda H, Takahashi J, Iwakami N, Kimura T, Hoki S, Mozumi-Kitamura K, Ono S, Hashimoto N. Grafting neural stem cells improved the impaired spatial recognition in ischemic rats. *Neurosci Lett.* 2001 Dec 4;316(1):9-12
- Tombran-Tink J, Mazuruk K, Rodriguez IR, Chung D, Linker T, Englander E, Chader GJ. Organization, evolutionary conservation, expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a unique neurotrophic serpin. *Mol Vis.* 1996 Nov 4;2:11
- Toth C, Martinez JA, Liu WQ, Diggle J, Guo GF, Ramji N, Mi R, Hoke A, Zochodne DW. Local erythropoietin signaling enhances regeneration in peripheral axons. *Neuroscience.* 2008 Jun 23;154(2):767-783

- Tripathi A, Kathuria N, Kumar A. Elastic and macroporous agarose-gelatin cryogels with isotropic and anisotropic porosity for tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2009 Sep 1;90(3):680-694
- Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N, Groszer M, Matter C, Gao J, Liu X, Wu H, Carmichael ST. A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *J Neurosci* 2006; 26:1269–1274
- Tsirka SE Clinical implications of the involvement of tPA in neuronal cell death. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* 1997, 75:341-347
- Tsuji O, Miura K, Okada Y, Fujiyoshi K, Mukaino M, Nagoshi N, Kitamura K, Kumagai G, Nishino M, Tomisato S, Higashi H, Nagai T, Katoh H, Kohda K, Matsuzaki Y, Yuzaki M, Ikeda E, Toyama Y, Nakamura M, Yamanaka S, Okano H. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107:12704–12709
- Tsukatani T, Fillmore HL, Hamilton HR, Holbrook EH, Costanzo RM. Matrix metalloproteinase expression in the olfactory epithelium. *Neuroreport* 2003; 14(8):1135-1140
- Tsuzuki N, Miyazawa T, Matsumoto K, Nakamura T, Shima K, Chigasaki H. Hepatocyte growth factor reduces infarct volume after transient focal cerebral ischemia in rats. *Acta Neurochir Suppl*. 2000;76:311-316
- Tureyen K, Vemuganti R, Bowen KK, Sailor KA, Dempsey RJ. EGF and FGF-2 infusion increases post-ischemic neural progenitor cell proliferation in the adult rat brain. *Neurosurgery*. 2005; Dec;57(6):1254-1263
- Unsicker K, Strelau J. Functions of transforming growth factor-beta isoforms in the nervous system. Cues based on localization and experimental in vitro and in vivo evidence. *Eur J Biochem*. 2000 Dec;267(24):6972-6975
- van der Stelt M, Veldhuis WB, van Haaften GW, Fezza F, Bisogno T, Bar PR, Veldink GA, Vliegenthart JF, Di Marzo V, Nicolay K. Exogenous anandamide protects rat brain against acute neuronal injury in vivo. *J Neurosci*. 2001 Nov 15;21(22):8765-8771
- Vandeputte C, Thomas D, Dresselaers T, Crabbe A, Verfaillie C, Baekelandt V, Van Laere K, Himmelreich U. Characterization of the inflammatory response in a photothrombotic stroke model by MRI: implications for stem cell transplantation. *Mol Imaging Biol* 2010 DOI 10.1007/s11307-010-0395-9
- Veldhuis WB, van der Stelt M, Delmas F, Gillet B, Veldink GA, Vliegenthart JF, Nicolay K, Bär PR. In vivo excitotoxicity induced by ouabain, a Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibitor. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003 Jan;23(1):62-74
- Veldhuis WB, van der Stelt M, Wadman MW, van Zadelhoff G, Maccarrone M, Fezza F, Veldink GA, Vliegenthart JF, Bär PR, Nicolay K, Di Marzo V. Neuroprotection by the endogenous cannabinoid anandamide and arvanil against in vivo excitotoxicity in the rat: role of vanilloid receptors and lipoxygenases. *J Neurosci*. 2003 May 15;23(10):4127-4133
- Vendrame M, Cassady J, Newcomb J, Butler T, Pennypacker KR, Zigova T, Sanberg CD, Sanberg PR, Willing AE. Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume. *Stroke*. 2004 Oct;35(10):2390-2395
- Vila N, Reverter JC, Yagüe J, Chamorro A. Interaction between interleukin-6 and the natural anticoagulant system in acute stroke. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20: 325–329
- Vila N, Castillo J, Dávalos A, Esteve A, Planas AM, Chamorro A. Levels of anti-inflammatory cytokines and neurological worsening in acute ischemic stroke. *Stroke* 2003; 34: 671–675
- Vogelgesang A, May VE, Grunwald U, Bakkeboe M, Langner S, Wallaschofski H, Kessler C, Bröker BM, Dressel A. Functional status of peripheral blood T-cells in ischemic stroke patients. *PLoS One* 2010; 5: e8718

- Wada K, Sugimori H, Bhide PG, Moskowitz MA, Finklestein SP. Effect of basic fibroblast growth factor treatment on brain progenitor cells after permanent focal ischemia in rats. *Stroke*. 2003 Nov;34(11):2722-2728
- Wahlgren NG, Ahmed N. Neuroprotection in cerebral ischemia: Facts and fancies—the need for new approaches. *Cerebrovascular Dis* 2004; 17[Suppl 1]:153–166
- Wakabayashi K, Nagai A, Sheikh AM, Shiota Y, Narantuya D, Watanabe T, Masuda J, Kobayashi S, Kim SU, Yamaguchi S. Transplantation of human mesenchymal stem cells promotes functional improvement and increased expression of neurotrophic factors in a rat focal cerebral ischemia model. *J Neurosci Res*. 2010; Apr;88(5):1017-1025
- Walczak P, Chen N, Hudson JE, Willing AE, Garbuzova-Davis SN, Song S, Sanberg PR, Sanchez-Ramos J, Bickford PC, Zigova T. Do hematopoietic cells exposed to a neurogenic environment mimic properties of endogenous neural precursors? *J Neurosci Res*. 2004; Apr 15;76(2):244-254
- Walczak P, Chen N, Eve D, Hudson J, Zigova T, Sanchez-Ramos J, Sanberg PR, Sanberg CD, Willing AE. Long-term cultured human umbilical cord neural-like cells transplanted into the striatum of NOD SCID mice. *Brain Res Bull*. 2007 Sep 14;74(1-3):155-163
- Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* 2004; 35: 1732–1737
- Wang X, Yue TL, Young PR, Barone FC, Feuerstein GZ Expression of interleukin-6, c-fos, and zif268 mRNAs in rat ischemic cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1995 Jan;15(1):166-171
- Wang Y, Jin K, Mao XO, Xie L, Banwait S, Marti HH, Greenberg DA. VEGF-overexpressing transgenic mice show enhanced post-ischemic neurogenesis and neuromigration. *J Neurosci Res*. 2007 Mar;85(4):740-747
- Wang Y, Qin ZH. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis*. 2010; Nov;15(11):1382-1402
- Watanabe T, Okuda Y, Nonoguchi N, Zhao MZ, Kajimoto Y, Furutama D, Yukawa H, Shibata MA, Otsuki Y, Kuroiwa T, Miyatake S. Postischemic intraventricular administration of FGF-2 expressing adenoviral vectors improves neurologic outcome and reduces infarct volume after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004; Nov;24(11):1205-1213
- Wei L, Han BH, Li Y, Keogh CL, Holtzman DM, Yu SP. Cell Death Mechanism and Protective Effect of Erythropoietin after Focal Ischemia in the Whisker-Barrel Cortex of Neonatal Rats. *J. Pharm. Exp Ther*. 2006; 317, 109- 116
- Wennberg L, Czech KA, Larsson LC, Mirza B, Bennet W, Song Z, Widner H. Effects of immunosuppressive treatment on host responses against intracerebral porcine neural tissue xenografts in rats. *Transplantation*. 2001 Jun 27;71(12):1797-1806
- Wennersten A, Meier X, Holmin S, Wahlberg L, Mathiesen T. Proliferation, migration, and differentiation of human neural stem/progenitor cells after transplantation into a rat model of traumatic brain injury. *J Neurosurg* 2004; 100: 88–96
- Wiessner C, Gehrman J, Lindholm D, Töpper R, Kreutzberg GW, Hossmann KA. Expression of transforming growth factor-beta 1 and interleukin-1 beta mRNA in rat brain following transient forebrain ischemia. *Acta Neuropathol*. 1993;86(5):439-446
- Williams K, Dooley N, Ulvestad E, Becher B, Antel JP. IL-10 production by adult human derived microglial cells. *Neurochem Int* 1996; 29: 55
- Willing AE, Lixian J, Milliken M, Poulos S, Zigova T, Song S, Hart C, Sanchez-Ramos J, Sanberg PR. Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke. *J Neurosci Res*. 2003 Aug 1;73(3):296-307

- Wittko IM, Schänzer A, Kuzmichev A, Schneider FT, Shibuya M, Raab S, Plate KH. VEGFR-1 regulates adult olfactory bulb neurogenesis and migration of neural progenitors in the rostral migratory stream in vivo. *J Neurosci*. 2009 Jul 8;29(27):8704-8714
- Wojcik L, Sawicka A, Rivera S, Zalewska T. Neurogenesis in gerbil hippocampus following brain ischemia: focus on the involvement of metalloproteinases. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2009; 69: 52–61
- Wojcik-Stanaszek L, Sypecka J, Szymczak P, Ziemka-Nalecz M, Khrestchatisky M, Rivera S, Zalewska T. The potential role of metalloproteinases in neurogenesis in the gerbil hippocampus following global forebrain ischemia. *PLoS One*. 2011; 6(7):e22465
- Wong AM, Hodges H, Horsburgh K. Neural stem cell grafts reduce the extent of neuronal damage in a mouse model of global ischaemia. *Brain research* 2005; 1063: 140–150
- Wood MJ, Sloan DJ, Wood KJ, Charlton HM. Indefinite survival of neural xenografts induced with anti-CD4 monoclonal antibodies. *Neuroscience* 1996; 70, 775–789
- Xi J, Khalil M, Shishechian N, Hannes T, Pfannkuche K, Liang H, Fatima A, Hausteim M, Suhr F, Bloch W, Reppel M, Saric T, Wernig M, Janisch R, Brockmeier K, Hescheler J, Pillekamp F. Comparison of contractile behavior of native murine ventricular tissue and cardiomyocytes derived from embryonic or induced pluripotent stem cells. *FASEB J*. 2010; 24:2739–2751
- Xia G, Hong X, Chen X, Lan F, Zhang G, Liao L. Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood alleviates hypoxic ischemic brain injury in rat neonates. *J Perinat Med*. 2010 Mar;38(2):215-221
- Xiao J, Nan Z, Motooka Y, Low WC. Transplantation of a novel cell line population of umbilical cord blood stem cells ameliorates neurological deficits associated with ischemic brain injury. *Stem Cells Dev*. 2005 Dec;14(6):722-733
- Xing C, Arai K, Lo EH, Hommel M Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int J Stroke*. 2012 Jul;7(5):378-385
- Yabe T, Kanemitsu K, Sanagi T, Schwartz JP, Yamada H. Pigment epithelium-derived factor induces pro-survival genes through cyclic AMP-responsive element binding protein and nuclear factor kappa B activation in rat cultured cerebellar granule cells: Implication for its neuroprotective effect. *Neuroscience*. 2005;133(3):691-700
- Yagita Y, Kitagawa K, Ohtsuki T, Takasawa K, Miyata T, Okano H, Hori M, Matsumoto M. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke*. 2001; Aug;32(8):1890-1896
- Yamasaki Y, Matsuo Y, Zagorski J, Matsuura N, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K New therapeutic possibility of blocking cytokine-induced neutrophil chemoattractant on transient ischemic brain damage in rats. *Brain Res*. 1997 Jun 6;759(1):103-111
- Yamashita T, Ninomiya M, Hernández Acosta P, García-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T, Araki N, Abe K, Okano H, Sawamoto K. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci*. 2006 Jun 14;26(24):6627-6636
- Yamashita T, Deguchi K, Nagotani S, Kamiya T, Abe K. Gene and stem cell therapy in ischemic stroke. *Cell Transplant*. 2009;18(9):999-1002
- Yamashita T, Abe K. Mechanisms of endogenous endothelial repair in stroke. *Curr Pharm Des*. 2012;18(25):3649-3652
- Yan YP, Sailor KA, Vemuganti R, Dempsey RJ. Insulin-like growth factor-1 is an endogenous mediator of focal ischemia-induced neural progenitor proliferation. *Eur. J. Neurosci*. 2006; 24, 45–54
- Yan YP, Sailor KA, Lang BT, Park SW, Vemuganti R, Dempsey RJ. Monocyte chemoattractant protein-1 plays a critical role in neuroblast migration after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007; Jun;27(6):1213-1224



- Yang P, Arnold SA, Habas A, Hetman M, Hagg T. Ciliary neurotrophic factor mediates dopamine D2 receptor-induced CNS neurogenesis in adult mice. *J Neurosci*. 2008 Feb 27;28(9):2231-2241
- Yang QC, Zhang XD, Liang CC, Du Y, Li HW. Functional evaluation of stroke patients 6 months after intrathecal injection of neural stem cells. *Chinese J Clin Rehab* 2005;9:208–210
- Yang Y, Candelario-Jalil E, Thompson JF, Cuadrado E, Estrada EY, Rosell A, Montaner J, Rosenberg GA. Increased intranuclear matrix metalloproteinase activity in neurons interferes with oxidative DNA repair in focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 2010;112(1):134-149
- Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007; Apr;27(4):697-709
- Yasuhara T, Hara K, Maki M, Xu L, Yu G, Ali MM, Masuda T, Yu SJ, Bae EK, Hayashi T, Matsukawa N, Kaneko Y, Kuzmin-Nichols N, Ellovitch S, Cruz EL, Klasko SK, Sanberg CD, Sanberg PR, Borlongan CV. Mannitol facilitates neurotrophic factor up-regulation and behavioural recovery in neonatal hypoxic-ischaemic rats with human umbilical cord blood grafts. *J Cell Mol Med*. 2010 Apr;14(4):914-921
- Yilmaz G, Granger DN. Leukocyte Recruitment and Ischemic Brain Injury. *Neuromolecular Medicine* 2010, 12:193-204
- Yoshimura S, Teramoto T, Whalen MJ, Irizarry MC, Takagi Y, Qiu J, Harada J, Waeber C, Breakefield XO, Moskowitz MA. FGF-2 regulates neurogenesis and degeneration in the dentate gyrus after traumatic brain injury in mice. *J Clin Invest*. 2003; Oct;112(8):1202-1210
- Young A, Assey KS, Sturkie CD, West FD, Machacek DW, Stice SL. Glial cell line-derived neurotrophic factor enhances in vitro differentiation of mid-/hindbrain neural progenitor cells to dopaminergic-like neurons. *J Neurosci Res*. 2010; Nov 15;88(15):3222-3232
- Yu ZF, Bruce-Keller AJ, Goodman Y, Mattson MP. Uric acid protects neurons against excitotoxic and metabolic insults in cell culture, and against focal ischemic brain injury in vivo. *Journal of Neuroscience Research* 1998; 53:613-625
- Zaremba J, Skrobanski P, Losy J Tumour necrosis factor-alpha is increased in the cerebrospinal fluid and serum of ischaemic stroke patients and correlates with the volume of evolving brain infarct. *Biomed Pharmacother*. 2001 Jun;55(5):258-263
- Zawadzka M, Lukasiuk K, Machaj EK, Pojda Z, Kamińska B. Lack of migration and neurological benefits after infusion of umbilical cord blood cells in ischemic brain injury. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2009;69(1):46-51
- Zhang J, Li Y, Chen J, Yang M, Katakowski M, Lu M, Chopp M. Expression of insulin-like growth factor 1 and receptor in ischemic rats treated with human marrow stromal cells. *Brain Res*. 2004 Dec 24;1030(1):19-27
- Zhang RL, Chopp M, Jiang N, Tang WX, Probstak J, Manning AM, Anderson DC: Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat. *Stroke* 1995, 26:1438-1442
- Zhang RL, LeTourneau Y, Gregg SR, Wang Y, Toh Y, Robin AM, Zhang ZG, Chopp M. Neuroblast division during migration toward the ischemic striatum: a study of dynamic migratory and proliferative characteristics of neuroblasts from the subventricular zone. *J Neurosci* 2007; 27:3157–162
- Zhang RL, Zhang ZG, Chopp M. Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone. *Neuropharmacology* 2008; 55(3):345-352
- Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Zhang R, Davies K, Powers C, Bruggen Nv, Chopp M Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Zhang R, Davies K, Powers C, Bruggen Nv, Chopp M *J Clin Invest*. 2000 Oct;106(7):829-838

- Zhang ZG, Jiang Q, Zhang R, Zhang L, Wang L, Zhang L, Arniago P, Ho KL, Chopp M. Magnetic resonance imaging and neurosphere therapy of stroke in rat. *Ann Neurol*. 2003 Feb;53(2):259-263
- Zhao LR, Berra HH, Duan WM, Singhal S, Mehta J, Apkarian AV, Kessler JA. Beneficial effects of hematopoietic growth factor therapy in chronic ischemic stroke in rats. *Stroke* 2007; 38:2804–2811
- Zhao Y, Nakagawa T, Itoh S, Inamori K, Isaji T, Kariya Y, Kondo A, Miyoshi E, Miyazaki K, Kawasaki N, Taniguchi N, Gu J. N-acetylglucosaminyltransferase III antagonizes the effect of N-acetylglucosaminyltransferase V on alpha3beta1 integrin-mediated cell migration. *J Biol Chem* 2006; 281(43):32122-32130
- Zhao Y, Rempe DA. Targeting astrocytes for stroke therapy. *Neurotherapeutic* 2010; 7: 439–451
- Zheng W, Nowakowski RS, Vaccarino FM. Fibroblast growth factor 2 is required for maintaining the neural stem cell pool in the mouse brain subventricular zone. *Dev Neurosci*. 2004 Mar-Aug;26(2-4):181-196
- Zhong XY, Zhang B, Asadollahi R, Low SH, Holzgreve W. Umbilical cord blood stem cells: what to expect. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Sep;1205:17-22
- Zhu DY, Liu SH, Sun HS, Lu YM Expression of inducible nitric oxide synthase after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult rodent dentate gyrus. *J Neurosci*. 2003 Jan 1;23(1):223-239
- Zhu Y, Lee C, Shen F, Du R, Young WL, Yang GY. Angiopoietin-2 facilitates vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in the mature mouse brain. *Stroke*. 2005 Jul;36(7):1533-1537
- Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci*. 1998 Jul;11(4):234-245
- Zigova T, Song S, Willing AE, Hudson JE, Newman MB, Saporta S, Sanchez-Ramos J, Sanberg PR. Human umbilical cord blood cells express neural antigens after transplantation into the developing rat brain. *Cell Transplant*. 2002;11(3):265-274
- Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT. Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem Cell Biol*. 2008 Oct;130(4):635-653
- Zychowicz M, Mehn D, Ruiz A, Frontczak-Baniewicz M, Rossi F, Buzanska L. Patterning of human cord blood-derived stem cells on single cell posts: implication for neural commitment. *Acta Neurobiol Exp* 2012;72(4):325-336

## STRESZCZENIE

Odkrycie neuralnych komórek macierzystych (NSC) o właściwościach neurogennych w mózgu dorosłych osobników otworzyło możliwości repopulacji uszkodzeń OUN. Wyniki badań ostatnich lat wykazały aktywną neurogenezę w strefach neurogennych i zdolność migracji powstałych neuroblastów u ludzi, co świadczy o możliwości powstawania nowych neuronów w ciągu całego okresu życia. Pomimo istnienia neuralnych komórek macierzystych, OUN ma ograniczoną zdolność samoodnowy, szczególnie w stanach patologicznych. Uszkodzenie mózgu spowodowane niedokrwieniem stymuluje proliferację endogennych progenitorów neuralnych, jednak większość nowopowstałych komórek obumiera w ciągu pierwszych kilku tygodni po udarze, stąd koncepcja wspomaganie odbudowy zniszczonych struktur poprzez zastosowanie egzogennych komórek macierzystych wydaje się być wielką nadzieją w leczeniu chorób neurologicznych.

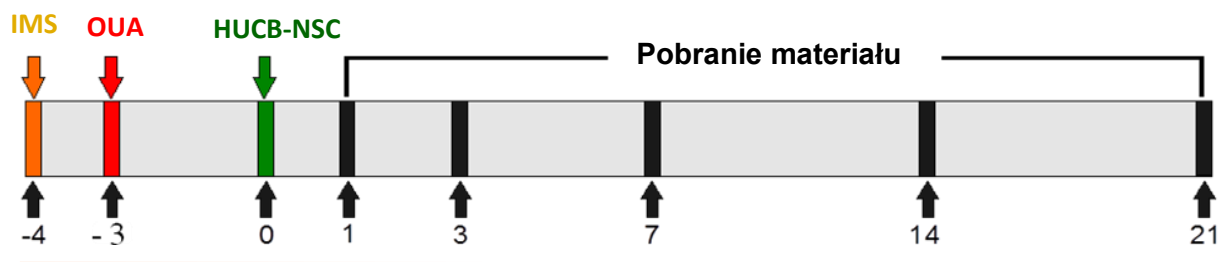
Terapia regeneracyjna nieodwracalnie uszkodzonych tkanek za pomocą przeszczepów komórek macierzystych skupiła uwagę środowisk medycznych i opinii publicznej z chwilą opracowania przez Thomsona w roku 1998 metody otrzymywania i długotrwałej hodowli ludzkich komórek embrionalnych (ESC). Nieograniczony wzrost ESC *in vitro* i ich zdolność różnicowania we wszystkie komórki organizmu sprawia, że stanowią przedmiot zainteresowania wielu naukowców. Jednak te cechy niosą ze sobą zagrożenie powstania nowotworów po przeszczepie komórek embrionalnych *in vivo*. Niestabilność genetyczna ESC oraz ograniczenia etyczno-prawne w pozyskiwaniu komórek z zarodków i płodów ludzkich sprawiły, że zaczęto poszukiwać komórek macierzystych o potencjale neuralnym poza OUN. Bogatym źródłem komórek macierzystych okazała się krew pępowinowa, z uwagi na zawartość progenitorów będących na wcześniejszym etapie rozwoju, bardziej plastycznych i mniej immunogennych w porównaniu z innymi tkankami.

Dotychczasowe wyniki naszych badań eksperymentalnych *in vitro* z udziałem komórek z krwi pępowinowej są bardzo obiecujące, jednak wprowadzenie egzogennych komórek macierzystych do kliniki w celu leczenia chorych po udarze wymaga badań przedklinicznych przeprowadzonych na zwierzętach laboratoryjnych. Postęp w tej dziedzinie zależy od opracowania modeli eksperymentalnych pozwalających na długotrwałe przeżycie przeszczepionych komórek w celu zbadania mechanizmów odpowiedzialnych za procesy proliferacji i różnicowania oraz tworzenie struktur nerwowych w mózgu biorców.

Celem moich badań była ocena działania ludzkich neuralnych komórek macierzystych krwi pępowinowej po ich przeszczepie u szczurów poddanych uszkodzeniu mózgu oraz prześledzenie *in vivo* wzajemnych relacji komórek dawcy i biorcy

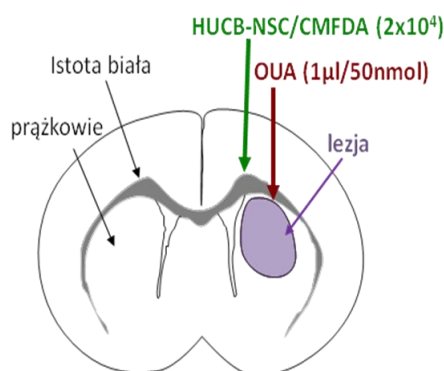
Przedmiotem badań były neuralne komórki macierzyste ustalonej nietransformowanej linii wyprowadzonej w naszym zakładzie z ludzkiej krwi pępowinowej (HUCB-NSC). Wybrany model cytotoksycznego uszkodzenia mózgu z zastosowaniem inhibitora pompy sodowo-potasowej (ouabainy) odpowiada w klinice niewielkim uszkodzeniom struktur głębokich mózgu, które ze względu na swoją lokalizację powodują znaczące i trudno poddające się rehabilitacji deficyty neurologiczne.

Badania wykonano u dorosłych szczurów szczepu Wistar (samców) w wieku 3 miesięcy o ciężarze ciała 250-280 g pochodzących z Charles River Sulzfeld, hodowanych w zwierzętarni naszego Instytutu, według następującego schematu:



IMS–immunosupresja; OUA–uszkodzenie mózgu ouabainą; HUCB-NSC–przeszczep komórek

Po podaniu ouabainy do prążkowie szczura (model cytotoksycznego uszkodzenia mózgu) wstrzykiwano do istoty białej ludzkie progenitory neuralne krwi pępowinowej (HUCB-NSC)



Cel pracy doktorskiej był realizowany w oparciu o badania *in vivo* dotyczące:

- oceny przeżycia, proliferacji, różnicowania i migracji ludzkich neuralnych komórek macierzystych z krwi pępowinowej (HUCB-NSC) przeszczepianych do istoty białej mózgu szczura, w eksperymentalnym modelu uszkodzenia prążkowie ouabainą
- charakterystyki parametrów wrodzonej i adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej w mózgu biorców przeszczepu HUCB-NSC po zastosowaniu różnych metod immunosupresji
- oceny procesów endogennej neurogenezy w rejonach SVZ i SGZ mózgu szczura oraz aktywności metaloproteinaz po uszkodzeniu prążkowie ouabainą i transplantacji HUCB-NSC
- identyfikacji endogennych (pochodzenia biorcy) i egzogennych (pochodzenia dawcy) czynników neurotroficznych/neuroprotektynnych obecnych w mózgu szczura po uszkodzeniu prążkowie ouabainą i przeszczepieniu komórek HUCB-NSC

Do oceny endogennych i egzogennych komórek w mózgu szczura stosowano metody immunohistochemiczne i wizualizację w mikroskopie konfokalnym, do określenia aktywności metaloproteinaz techniką zymografii *in situ*, do analizy ekspresji genów reakcje RT-PCR i RT-PCR w czasie rzeczywistym (RealTime RT-PCR). Materiał stanowiły mózgi szczura pobierane od zwierząt doświadczalnych w sekwencji czasowej 1 - 21 dni po przeszczepie HUCB-NSC zgodnie z protokołem określonym dla poszczególnych badań eksperymentalnych.

Otrzymane wyniki pozwalają podsumować badania i sformułować następujące wnioski:

- Przeszczepione do mózgu dorosłego szczura ludzkie progenitory neuralne krwi pępowinowej (HUCB-NSC) w większości pozostają w miejscu wszczepu, mają niski stopień proliferacji i ograniczoną zdolność migracji. Nie wykazują ekspresji antygenów typowych dla dojrzałych neuronów, krótko przeżywają w mózgu biorców, są eliminowane po 10-14 dniach
- Analiza parametrów miejscowej odpowiedzi immunologicznej w mózgu szczurów po uszkodzeniu ouabainą i transplantacji HUCB-NSC wskazuje na pobudzenie efektorów zarówno wrodzonej (nieswoistej) jak i adaptacyjnej (swoistej) reakcji gospodarza. Zastosowanie immunosupresji (CsA; CsA+DepoMedrol+Azatioprina) i odczulania biorców nie wpływa na wielkość odpowiedzi immunologicznej i nie przedłuża przeżycia przeszczepu
- Przeszczep komórek ludzkich (HUCB-NSC) w postaci 3D agregatów na platformach polimerowych zapewnia przeżycie komórkom dawcy ograniczając odczyn zapalny. Pozostające wewnątrz struktur komórki są żywe, dzielą się, różnicując w młode neurony, jednak nie opuszczają swojej „niszy” i nie migrują do tkanki, a po biodegradacji szkieletów są eliminowane z mózgu biorców
- Pobudzenie neurogenezy w mózgu szczura po uszkodzeniu ouabainą jest dodatkowo wzmocnione przez przeszczep ludzkich progenitorów neuralnych (HUCB-NSC). Wraz ze wzrostem proliferujących w strefach SVZ i SGZ endogennych komórek, obserwuje się zwiększenie liczby migrujących w kierunku uszkodzenia neuroblastów i podwyższenie aktywności metaloproteinaz
- Transplantacja komórek ludzkich (HUCB-NSC) u zwierząt po ischemii powoduje dodatkowo zwiększenie poziomu endogennych czynników neurotroficznych stymulowanych wcześniej uszkodzeniem OUN. Przeszczepione progenitory neuralne są także źródłem ludzkich czynników troficznych, których obecność stwierdza się w mózgu biorców po transplantacji
- Krótkotrwałe przeżycie ludzkich progenitorów neuralnych po ich przeszczepieniu do mózgu szczurów nie pozwala na podjęcie funkcji repopulacji uszkodzonych struktur nerwowych z uwagi na szybką eliminację komórek dawcy przez komórki immunologiczne gospodarza
- W świetle naszych badań pozytywne efekty transplantacji komórek obserwowane wcześniej w testach behawioralnych są wynikiem pośredniego działania egzogennych komórek (uwalnianie czynników wzrostu, neuromorfogenów, czynników antyapoptotycznych i immunomodulacyjnych), korzystnego z punktu widzenia stymulacji endogennych procesów naprawczych w uszkodzonej tkance
- Zapewnienie optymalnego mikrośrodowiska do proliferacji, migracji i różnicowania endogennych progenitorów neuralnych, a także ochronnego działania w stosunku do dojrzałych neuronów wydaje się najważniejszym celem terapii z zastosowaniem przeszczepów komórek somatycznych w chorobach OUN

## ABSTRACT

---

Restricted blood flow to the brain following a cerebral artery blockage causes the death of neurons, astrocytes, oligodendrocytes and synaptic damage. The discovery of neural stem cells (NSC) with neurogenic properties in the adult brain has opened the possibility of re-population of CNS damage. Recent studies have shown that following stroke, the generation of new neurons from endogenous NSC and their migration to the sites of injury occurs. However, the vast majority of the newly formed neuroblasts die during the early stages of their development after the insult and re-population of damaged structures by endogenous NSC is at about 0.2%. Stem cell-based approaches are of particular interest with the potential to provide completely novel therapies to restore function in stroke. These approaches are based on delivering stem cells from different sources through intracerebral transplantation or systemic injection, or to target the adult brain own neural progenitor cells and modulate their function.

A large number of studies have used neural progenitors isolated from the different sources and test them after transplantation in different models of stroke. Studies in which the cells were of human origin are the most interesting ones because it is highly likely that only human-derived cells will be approved for use in the clinical setting. A particularly valuable sources of stem cells are postnatal tissues including cord blood. Umbilical cord blood stem cells in contrast to other somatic stem cells are less mature and therefore less immunogenic, and have higher proliferation potential associated with extended life span.

The previous results of our *in vitro* studies evaluating the functional potential of human umbilical cord blood-derived neural stem cells were very promising. However, understanding the properties of these cells when implanted in the stroke-damaged brain of animals and the capacity of the grafts to improve stroke-impaired function will be particularly important for their clinical translation. Transplanted stem cells can improve function not only by replacing dead neurons (direct effect) but also by trophic actions, modulation of inflammation, stimulation of angiogenesis and neuroprotection (bystander effect).

The aim of the studies was to verify neural stem cells derived from human umbilical cord blood as a transplant material for cell therapy of focal brain damage in rats.

For that purpose, human neural stem cells isolated from umbilical cord blood (HUCB-NSC) non-transformed cell line established in our laboratory was used as the transplantation material. The studies were performed in adult male Wistar rats (250-280 g). During the ongoing experiments the animals were kept in breeding cages in 12:12 photoperiod with continuous access to food and water. All procedures were in accordance with European Union Guidelines approved by the Fourth Warsaw Local Ethics Committee. Cytotoxic brain injury model using the inhibitor sodium-potassium pump (ouabain) has been developed in our laboratory. Inhibition of the Na/K pump causes metabolic and structural changes mimicking ischemic stroke. This experimental model of focal brain injury corresponds to a small damage of the deep brain structures occurring in clinical situations.

Based on the results from my studies we have shown that:

- Transplantation of neural stem cells isolated from human umbilical cord blood (HUCB-NSC) into rat model of stroke, causes activation of both innate (macrophages and neutrophils) and acquired (T and B lymphocytes) immune response of the recipient. This leads to short survival of human cells in the rat brain and prevents the long-term observation
- CsA or CsA+DepoMedrol+Azathioprine immunosuppression did not bring the expected results in a prolongation of graft survival. The presence of viable cells was seen in the donor tissue recipients immunosuppressed up to 14 days, only in a few cases viable donor cells were found at 21 days after transplantation. In none of the experimental groups, transplanted cell migration from the site of administration were observed
- Neonatal pre-immunization of graft recipients with HUCB-NSC did not reduce the immune response of the host nor extend the survival rate of donor cells. Transplanted HUCB-NSC were eliminated after 14-21 days of infusion. There was no migration of cells to the surrounding brain tissue
- The presence of human neural cells in the host brain after their transplantation into ouabain-injured rats stimulates endogenous neurogenesis in SVZ and SGZ zones. Additionally, the increase of metalloproteinase synthesis by newly formed neuroblasts migrating to damaged areas was noticed
- After transplantation of human neural stem cells into rat brain, the increased expression of neurotrophic factors, both of rat and human origin was observed. It is likely to be participated in the restoration of the disrupted neuronal circuitries

The results of our studies indicate that stem cell transplantation in stroke-damaged brain reveals the positive effect by promotion of endogenous neurogenesis through enhancement of SVZ and SGZ cell proliferation and newly formed neuroblast migration

In order to become clinically valuable, the stroke-induced neurogenic response has to be markedly enhanced. Of particular importance for the promotion of neurogenesis and its functional benefit would be to increase the survival of the stroke-induced neuroblasts and mature neurons. Before modulation of endogenous neurogenesis after stroke can be considered for the clinical use, it has to be shown in animal studies that increased neurogenesis is beneficial for functional recovery