

MARTYNA PODOBIŃSKA

Różnicowanie *in vitro* neuralnych komórek macierzystych
z ludzkiej krwi pępowinowej:
wpływ poziomu tlenu, związków niskocząsteczkowych
i geometrii przestrzennej mikrośrodowiska

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

Promotor pomocniczy – **dr Anna Sarnowska**

Pracownia Bioinżynierii Komórek Macierzystych
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. M. Mossakowskiego PAN



Warszawa 2017

Chciałabym podziękować...

Mężowi i Rodzinie

za wsparcie, cierpliwość i wyrozumiałość,
a także umożliwienie mi realizacji moich naukowych pasji,

Pani Prof. dr hab. Leonorze Bużańskiej

za ofiarowany mi czas,
cenne rady i pomoc podczas realizacji niniejszej pracy,

dr Ani Sarnowskiej

za pomoc, dobre rady oraz wsparcie, nie tylko naukowe,

Koleżankom i Kolegom, Pracownikom

Pracowni Bioinżynierii Komórek Macierzystych,

Zakładu Neurobiologii Naprawczej

oraz Zakładu Neurochemii

za wsparcie i uśmiech, dzięki którym
codzienne problemy młodego naukowca nie były aż tak straszne ;)

a także **Pani dr Hani Kozłowskiej** za to,
że pokazała mi kolorowy świat mikroskopii konfokalnej :)

SPIS TREŚCI

	WYKAZ SKRÓTÓW	6
1	WSTĘP	11
1.1	Wprowadzenie	11
1.2	Nisza Komórek Macierzystych	12
1.3	Neuralne Komórki Macierzyste (NSC)	16
1.3.1	Metody otrzymywania Neuralnych Komórek Macierzystych	18
1.3.2	Linia neuralnych komórek macierzystych wyprowadzona z krwi pępowinowej (HUCB-NSC)	19
1.4	Różnicowanie Neuralnych Komórek Macierzystych	23
1.5	Hodowla <i>in vitro</i> - wpływ czynników mikrośrodowiskowych	27
1.5.1	Rusztowania trójwymiarowe	27
1.5.1.1	Właściwości fizykochemiczne rusztowań: wpływ na różnicowanie komórek macierzystych	29
1.5.2	Znaczenie stężenia tlenu w hodowli komórek macierzystych	32
1.5.2.1	Czynniki Indukowane Hipoksją (HIF)	34
1.5.2.2	Wpływ hipoksji i czynników HIF na różnicowanie i proliferację NSC	36
1.5.3	Zmiany epigenetyczne w różnicowaniu NSC	39
1.5.3.1	Modyfikacje epigenetyczne i enzymy za nie odpowiedzialne	39
1.5.3.2	Wpływ modyfikacji epigenetycznych na rozwój układu nerwowego i różnicowanie NSC	44
1.5.4	Związki niskocząsteczkowe modyfikujące różnicowanie NSC	47
2	HIPOTEZA I CEL PRACY	51

3	MATERIAŁY I METODY	52
3.1	Hodowla komórkowa HUCB-NSC w warunkach 2D	53
3.1.1	Ocena wpływu warunków tlenowych na komórki w różnych stadiach rozwoju	53
3.1.2	Ocena wpływu związków niskocząsteczkowych na komórki w stadium progenitorów neuralnych	55
3.2	Hodowla komórkowa HUCB-NSC na rusztowaniach 3D	55
3.3	Badanie ekspresji genów na poziomie mRNA	57
3.3.1	Izolacja i oczyszczanie mRNA	57
3.3.2	Odwrotna transkrypcja	58
3.3.3	Reakcja PCR i PCR w czasie rzeczywistym	58
3.4	Analiza immunocytochemiczna i analiza obrazu za pomocą mikroskopii konfokalnej	63
3.5	Analiza zasiedlenia badanych rusztowań komórkami HUCB-NSC z zastosowaniem elektronowego mikroskopu skaningowego	64
3.6	Analiza statystyczna	65
4	WYNIKI	66
4.1	Ocena wpływu warunków tlenowych na proliferację i różnicowanie HUCB-NSC na różnych etapach rozwoju	66
4.1.1	Analiza ekspresji wybranych genów rozwojowych, genów kodujących enzymy epigenetyczne oraz czynników HIF na poziomie mRNA	67
4.1.2	Ocena ekspresji markerów proliferacji oraz różnicowania na poziomie białka	72
4.2	Ocena wpływu badanych związków niskocząsteczkowych na proces proliferacji i różnicowania HUCB-NSC	75
4.2.1	Analiza ekspresji wybranych genów rozwojowych, genów	75

	kodujących enzymy epigenetyczne oraz czynników HIF na poziomie mRNA	
4.2.2	Ocena ekspresji białek typowych dla proliferacji i różnicowania	87
4.3	Badanie wpływu wybranych typów rusztowań 3D na proces różnicowania i zdolność do proliferacji komórek HUCB-NSC	97
5	PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI	102
6	DYSKUSJA	106
6.1	Wpływ warunków tlenowych w hodowli na kierunki rozwoju komórek znajdujących się na różnych etapach rozwoju: zależność od czynników indukowanych hipoksją	108
6.1.1	Wpływ warunków tlenowych w hodowli na proliferację	114
6.2	Wpływ związków niskocząsteczkowych na różnicowanie i proliferację HUCB-NSC	115
6.3	Wpływ hodowli trójwymiarowej na różnicowanie i proliferację HUCB-NSC	125
6.4	Konkluzje	130
7	STRESZCZENIE	132
8	ABSTRACT	134
9	PIŚMIENNICTWO	136

WYKAZ SKRÓTÓW

5hmC	5-hydroksymetylcytozyna
5mC	5-metylcytozyna
AAS	roztwór antybiotyków i środków przeciwgrzybiczych do hodowli komórkowej (ang. <i>Antibiotic Antimycotic Solution</i>)
ACTB	β -aktyna (ang. <i>ACTin β</i>)
AM	cząsteczki odpowiedzialne za przyleganie komórek (ang. <i>Adhesion Molecules</i>)
ANOVA	analiza wariancji (ang. <i>Analysis Of Variance</i>)
ARNT	inna nazwa podjednostki HIF β (ang. <i>Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator</i>)
ASC	„dorosłe” komórki macierzyste (ang. <i>Adult Stem Cells</i>)
BDNF	neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. <i>Brain Derived Neurotropic Factor</i>)
bHLH	helisa-pętla-helisa (ang. <i>basic Helix-Loop-Helix</i>)
BM-MSC	mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego (ang. <i>Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells</i>)
BMP	białko morfogenetyczne kości (ang. <i>Bone Morphogenetic Protein</i>)
CSPG	proteoglikany siarczanu chondroityny (ang. <i>Chondroitin Sulfate ProteoGlycans</i>)
CpG	miejsca o dużej zawartości dwunukleotydów CG - cytozyny (C) i guaniny (G) następujących po sobie
CoREST	korepresor czynnika transkrypcyjnego REST (ang. <i>co-repressor for element-1-silencing transcription factor</i>)
dBcAMP	dwumaślan cyklicznego AMP (ang. <i>diButyryl cyclic Adenosine MonoPhosphate</i>)
DEPC	woda wolna od enzymów rozkładających RNA (ang. <i>DEPC treated water</i>)

DG	zakręt zębaty hipokampa (ang. <i>Dentate Gyrus</i>)
DMEM/F12	pożywka hodowlana (ang. <i>Dulbecco/Vogt Modified Eagle's Minimal Essential Medium</i>)
DMOG	inhibitor 4-prolyl hydroksylazy (ang. <i>prolyl-4-hydroxylase inhibitor</i>)
DNMT	metylotransferaza DNA (ang. <i>DNA MethylTransferase</i>)
ECM	macierz zewnątrzkomórkowa (ang. <i>ExtraCellular Matrix</i>)
EGF	naskórkowy czynnik wzrostu (ang. <i>Epidermal Growth Factor</i>)
EPO	erytropoetyna (ang. <i>Erythropoietin</i>)
ESC	zarodkowe komórki macierzyste (ang. <i>Embryonic Stem Cells</i>)
FBS	bydłęca surowica płodowa (ang. <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FGF2	czynnik wzrostu fibroblastów (ang. <i>Fibroblast Growth Factor 2</i>)
GADD45	białko zahamowania cyklu komórkowego indukowane uszkodzeniem DNA, które uczestniczy m.in. w demetylacji DNA (ang. <i>Growth Arrest and DNA-Damage-inducible protein</i>)
GAG	glikozaminoglikany (ang. <i>GlycosAminoGlycans</i>)
GalC	galaktozyloceramidaza, marker oligodendrocytów (ang. <i>GalactosylCeramidase</i>)
GFAP	kwaśne białko włóknkowe gleju (ang. <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)
HAT	acetylotransferaza histonów (ang. <i>Histone AcetylTransferase</i>)
HDAC	deacetylaza histonów (ang. <i>Histone DeACetylase</i>)
HDACi	inhibitory deacetylaz histonów (ang. <i>Histone DeACetylase inhibitors</i>)
HDM	demetylaza histonów (ang. <i>Histone DeMethylase</i>)
HIF	czynnik indukowany hipoksją (ang. <i>Hypoxia-Inducible Factor</i>)
HRE	miejsce wiązania HIF (ang. <i>HIF-Responsive Elements</i>)
HMT	metylotransferaza histonów (ang. <i>Histone MethylTransferase</i>)
HSC	hematopoetyczne komórki macierzyste (ang. <i>Haematopoietic Stem Cells</i>)
HSPG	proteoglikany siarczanu heparanu (ang. <i>Heparan Sulfate ProteoGlycans</i>)

HUCB-NSC	linia ludzkich neuralnych komórek macierzystych pochodząca z krwi pępowinowej (ang. <i>Human Umbilical Cord Blood derived Neural Stem Cells</i>)
ICM	węzeł zarodkowy blastocysty (ang. <i>Inner Cell Mass</i>)
IGF	insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. <i>Insulinlike Growth Factor</i>)
iNSC	indukowane neuralne komórki macierzyste (ang. <i>induced Neural Stem Cell</i>)
iPSC	indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (ang. <i>induced Pluripotent Stem Cells</i>)
KM	komórki macierzyste
LS	pożywka o niskiej zawartości surowicy (ang. <i>Low Serum</i>)
LSD1	specyficzna dla modyfikacji lizyny demetylaza histonowa (ang. <i>Lysine-Specific histone Demethylase 1</i>)
MAP2	białko towarzyszące mikrotubulom 2 (ang. <i>Microtubule Associated Protein 2</i>)
MBD	rodzina białek zawierających domenę wiążącą metylowane miejsca CpG (ang. <i>methyl-CpG-binding domain</i>)
MEF	mysie zarodkowe fibroblasty (ang. <i>mouse embryonic fibroblasts</i>)
miRNA	mikro RNA (ang. <i>microRNA</i>)
MSC	mezenchymalne komórki macierzyste (ang. <i>Mesenchymal Stem Cells</i>)
N-CoR	kompleks korepresora receptorów jądrowych (ang. <i>Nuclear receptor Co-Repressor</i>)
ncRNA	niekodujące RNA (ang. <i>non-coding RNA</i>)
NeuroD1	czynnik różnicowania neuronalnego 1 (ang. <i>Neuronal Differentiation 1</i>)
NGN1	neurogenina 1, Neurog1 (ang. <i>Neurogenin-1</i>)
NICD	wewnątrzkomórkowa domena receptora Notch (ang. <i>Notch Intracellular Domain</i>)

NF200	neurofilament ciężki o masie molekularnej 200kDa (ang. <i>200 kDa NeuroFilament protein</i>)
NG2	neuralny antygen glejowy 2 (ang. <i>Neural/Glial antigen 2</i>)
NGS	surowica kozia (ang. <i>Normal Goat Serum</i>)
NPC	neuralne komórki progenitorowe (ang. <i>Neural Progenitor Cells</i>)
NSC	neuralne komórki macierzyste (ang. <i>Neural Stem Cells</i>)
NuRD	kompleks deacetylazy i przebudowy nukleosomu (ang. <i>Nucleosome Remodeling and Deacetylase complex</i>)
OCT4	czynnik transkrypcyjny należący do rodziny POU, kluczowy dla samoodnowy komórek pluripotencjalnych (ang. <i>OCTamer-binding Transcription factor 4</i>)
OLIG2	czynnik transkrypcyjny oligodendrocytów (ang. <i>OLIGodendrocyte transcription factor 2</i>)
OPC	komórki prekursorowe oligodendrocytów (ang. <i>Oligodendrocyte Precursor Cells</i>)
OUN	Ośrodkowy Układ Nerwowy
PAS	rodzina czynników transkrypcyjnych zawierających domenę Per-ARNT-Sim
PBS	roztwór soli fizjologicznej w buforze fosforanowym (ang. <i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PDGFR α	receptor alfa płytkopochodnego czynnika wzrostu (ang. <i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor α</i>)
PLL	poli-L-lizyna
POU5F1	nazwa genu kodującego czynnik transkrypcyjny OCT4 (ang. <i>POU domain, class 5, transcription factor 1</i>)
PTM	modyfikacje post-translacyjne (ang. <i>Post-Translational Modifications</i>)
RA	kwasy retinowe (ang. <i>Retinoic Acid</i>)
RAR	receptor kwasu retinowego (ang. <i>Retinoic-Acid-Receptor</i>)

RMS	donosowy strumień migracyjny (ang. <i>Rostral Migratory Stream</i>)
SC	komórki macierzyste (ang. <i>Stem Cells</i>)
SF	pożywka bezsurowicza (ang. <i>Serum Free</i>)
SGZ	strefa podziarnista (ang. <i>SubGranular Zone</i>)
siRNA	małe interferujące RNA (ang. <i>small interfering RNA</i>)
SOX2	czynnik transkrypcyjny zaangażowany w utrzymanie stanu pluripotencji i zdolności do samoodnowy komórek macierzystych (ang. <i>Sex determining region Y-box 2</i>)
SVZ	strefa okołokomorowa komór bocznych (ang. <i>SubVentricular Zone</i>)
TET1	demetylaza DNA (ang. <i>tet methylcytosine dioxygenase 1</i>)
TGFβ	transformujący czynnik wzrostu beta (ang. <i>Transforming Growth Factor β</i>)
TSA	trichostatyna A - inhibitor deacetylaz histonów klasy I i II (ang. <i>trichostatin A</i>)
VEGF	czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
WJ	galareta Wharton'a – tkanka będąca częścią sznura pępowinowego (ang. <i>Wharton's Jelly</i>)

1. WSTĘP

1.1. Wprowadzenie

Jednym z wyzwań współczesnej medycyny regeneracyjnej jest otrzymywanie kompetentnych terapeutycznie komórek macierzystych (KM) (ang. *Stem Cells*, SCs), które zachowują zdolność do proliferacji prowadzącej do samoodnawiania i różnicowania w określonym kierunku. Brak zoptymalizowanych, powtarzalnych i ujednoliconych metod hodowli *in vitro* takich komórek uniemożliwia porównanie i jednoznaczną ocenę wyników terapii, w których są one stosowane. Odtworzenie warunków, w jakich komórki macierzyste występują w ich naturalnym środowisku - w endogennych niszach (warunki biomimetyczne) i zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw samoodnawiania i różnicowania tych komórek, jest kierunkiem badawczym wdrażanym w wielu laboratoriach na całym świecie (Daley i wsp. 2008, Lutolf i wsp. 2009, Bużańska i wsp. 2013).

W naturalnych niszach neuralnych komórek macierzystych (ang. *Neural Stem Cells*, NSC) w mózgu fizjologiczne stężenie tlenu jest wielokrotnie niższe od atmosferycznego i waha się w granicach 0,5 - 5% (Erecińska i Silver 2001). Wykazano, że poziom tlenu w hodowli ma zasadniczy wpływ na kierunek różnicowania neuralnych komórek macierzystych, a czynniki indukowane hipoksją (ang. *Hypoxia-Inducible Factors*, HIF's) zmieniają ekspresję genów regulujących procesy rozwojowe NSC (Gustafsson i wsp. 2005, Santilli i wsp. 2010, Zhao i wsp. 2014).

Wcześniejsze badania prowadzone w Pracowni Bioinżynierii Komórek Macierzystych wykazały, że niski poziom tlenu w hodowli (5%), jak również obecność związków niskocząsteczkowych regulujących odpowiedź epigenetyczną komórki (inhibitor metylotransferaz DNA i deacetylaz histonów) wpływają pozytywnie na reprogramowanie HUCB-NSC (ang. *Human Umbilical Cord Blood derived Neural Stem Cells*) do indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (ang. *induced Pluripotent Stem Cells*, iPSC) (Szabłowska-Gadomska i wsp. 2012), co więcej ich stopień proliferacji i zróżnicowania jest ściśle skorelowany ze zmianą epigenomu (Habich i wsp. 2013). Inne badania naszego zespołu wykazały, że geometria i skład powierzchni biofunkcjonalnych mają istotne znaczenie dla ukierunkowania rozwoju HUCB-NSC (Bużańska i wsp. 2009, 2010, Zychowicz i wsp. 2011, 2012).

Powyższe wyniki wskazują na zasadność stosowania w badaniach teoretycznych i aplikacyjnych niskiego, zbliżonego do występującego w mózgu, stężenia tlenu, związków wpływających na epigenom komórki oraz warunków trójwymiarowej hodowli.

Przedmiotem badań niniejszej pracy jest ustalenie najkorzystniejszych warunków *in vitro* do proliferacji i różnicowania neuralnych komórek macierzystych oraz przeprowadzenie analiz molekularnych, mających na celu określenie współzależności pomiędzy odpowiedzią komórek na obniżony poziom tlenu, ich statusem epigenetycznym i zdolnością do różnicowania. Ustalenie takich warunków wymaga jednoczesnego badania wielu czynników wpływających na odpowiedź komórki na bodźce zewnętrzne. W naszej opinii najważniejsze z nich to: architektura i skład mikrośrodowiska, stężenie tlenu oraz obecność związków stymulujących różnicowanie i wpływających na status epigenetyczny komórki. Dlatego prowadzone eksperymenty obejmują takie zmienne jak: 1) warunki 5% i 21% tlenu, 2) obecność czynników różnicujących (zawartość w pożywce surowicy oraz dBcAMP), 3) układy hodowlane dwuwymiarowe (2D), i rusztowania trójwymiarowe (3D) o różnym składzie i geometrii, 4) obecność substancji należących do grupy związków niskocząsteczkowych wpływających na status epigenetyczny i szlaki przekazywania sygnału związane z proliferacją i różnicowaniem komórki.

1.2. Nisza Komórek Macierzystych

Koncepcja niszy komórek macierzystych została zaproponowana przez Schofield'a prawie 40 lat temu. Wówczas idea istnienia specjalnego, wydzielonego anatomicznie miejsca, w którym w dorosłym organizmie niezróżnicowane komórki rezydują przez całe życie, budziła wiele kontrowersji. Dziś stanowi jedną z najważniejszych gałęzi w badaniach nad biologią komórek macierzystych (Schofield, 1978). Obecnie wiadomo, że zarówno struktura przestrzenna, jak i skład niszy wpływają na procesy rozwojowe przebywających w niej komórek i tylko dzięki odpowiednim sygnałom (chemicznemu, fizycznemu i biologicznemu) możliwa jest regulacja ich samoodnowy, różnicowania czy migracji.

Przez wiele lat uważano, że mózg rozwija się do pewnego momentu, po którym nie dochodzi w nim do żadnych zmian – neurony tworzą ściśle określone, niezmiennie szlaki, a ewentualne ubytki nie są zastępowane nowymi komórkami (Cajal 1913).

Jednakże, badania Altmana z 1962 roku wykazały obecność w mózgu szczurów komórek proliferujących, które dają początek nowym neuronom (Altman 1962), co podważyło dogmat Cajal'a. W 1989 roku Sally Temple udowodniła istnienie multipotencjalnych, samoodnawiających się komórek w strefie okołokomorowej w mysim mózgu (Ma i wsp. 2013).

Od 1998 roku dzięki badaniom Gage'a i jego współpracowników wiemy, że w organizmie dorosłego człowieka również zachodzi aktywna neurogeneza, która jest związana z wyższymi funkcjami poznawczymi i procesami pamięciowymi. W mózgu zidentyfikowano dwa obszary, w których zachodzi aktywna neurogeneza, nazywane niszami (ang. *niche*) neurogennymi, są to:

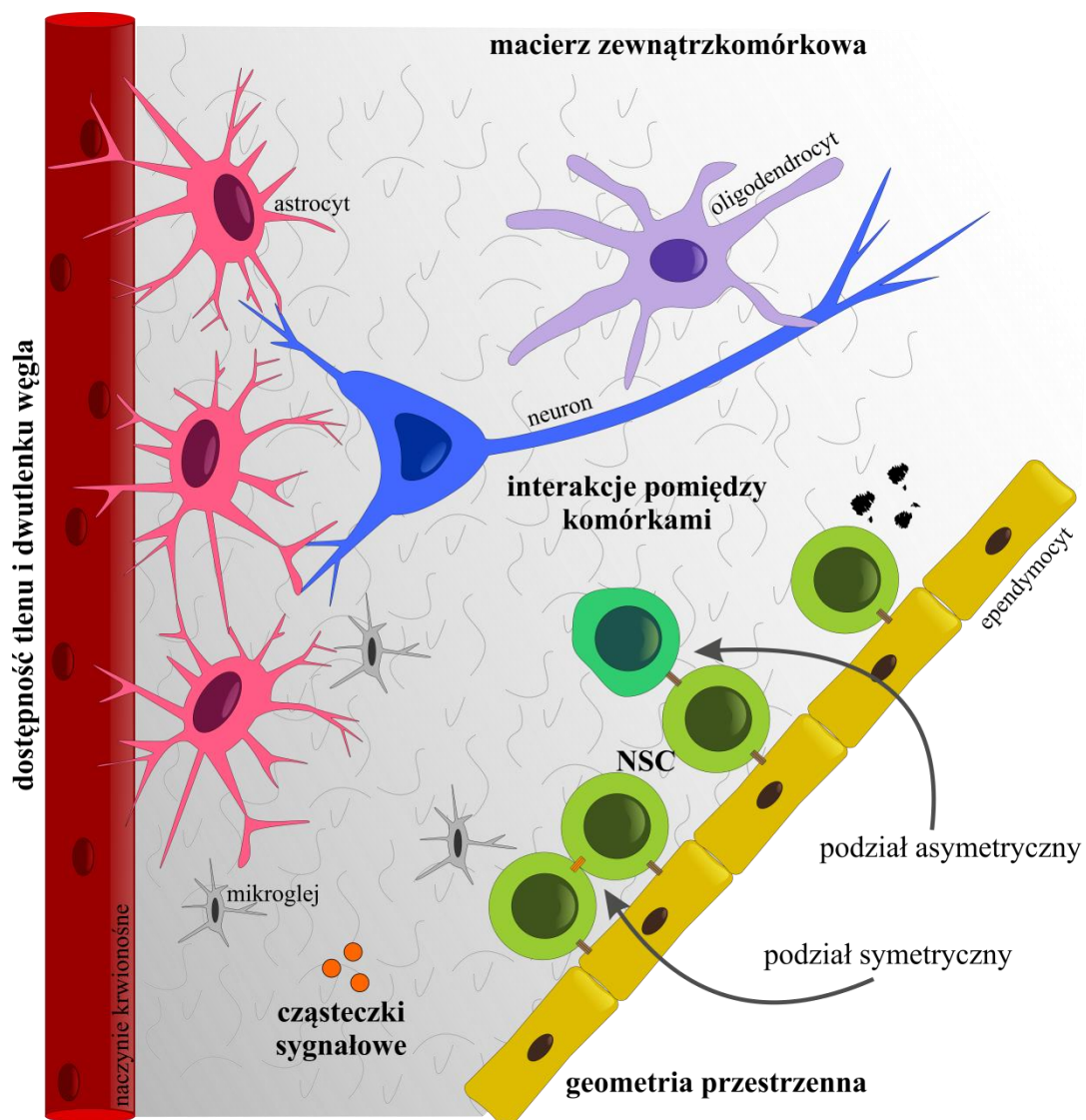
- strefa podziarnista (ang. *SubGranular Zone*, SGZ) obszaru zakrętu zębatego hipokampa (ang. *Dentate Gyrus*, DG),
- strefa okołokomorowa komór bocznych (ang. *SubVentricular Zone*, SVZ) (Eriksson i wsp. 1998, Kempermann i wsp. 2015).

Niszą neurogenną nazywamy mikrośrodowisko, w którym rezydują NSC, charakteryzujące się dynamicznymi zmianami zależnymi od stadium rozwojowego i warunków fizjologicznych oraz patologicznych.

Wspomniane powyżej naturalne nisze neuralnych komórek macierzystych obecne w mózgu człowieka: strefy SGZ i SVZ, różnią się od siebie budową, składem macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *ExtraCellular Matrix*, ECM) i typem komórek, które w nich występują. W obu niszach znajdują się komórki śródbłonna naczyń krwionośnych, jednakże tylko w SVZ występują ependymocyty (komórki wyściółki komór) (Doetsch, 2003). W obu regionach znajdują się komórki NSC, które wykazują pewne podobieństwo (molekularne i morfologiczne) do astrocytów. Obserwujemy w nich ekspresję białka GFAP (ang. *Glial Fibrillary Acidic Protein*), które występuje m.in. w astrocytach, przy równoczesnej obecności NESTYNY czy markera SOX2, charakterystycznego dla różnicowania neuronalnego (Giachino i wsp. 2014, Akkermann i wsp. 2016).

Nisza pełni kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu NSC. Rozwój układu nerwowego jest regulowany przez wiele sygnałów pochodzących zarówno z wnętrza komórki, jak i ze środowiska zewnętrznego. Komórki oddziałując z otaczającym je środowiskiem, otrzymują informacje od sąsiadujących komórek na

drodze parakrynowej i cytokrynowej - przez czynniki rozpuszczalne niszy oraz bezpośrednio przez złącza międzykomórkowe. Sygnały te pozwalają zaindukować podziały komórkowe, kierunek różnicowania komórek w określoną tkankę lub utrzymać je w stanie niezróżnicowanym. Do najważniejszych czynników kształtujących naturalną niszę KM, należą m.in. związane z obecnością naczyń krwionośnych: temperatura, dostępność tlenu i substancji odżywczych, a także cząsteczki sygnałowe i czynniki troficzne (np. czynniki wzrostu, cytokiny, hormony), geometria przestrzenna i związane z nią interakcje pomiędzy samymi komórkami, jak również komórkami i macierzą zewnątrzkomórkową (Ryc. 1).



Rycina 1. Schematyczne przedstawienie budowy niszy NSC. Czynniki mikrośrodowiska wpływające na procesy rozwojowe NSC zaznaczono pogrubioną czcionką.

NSC w odpowiedzi na bodźce wydzielają elementy macierzy zewnątrzkomórkowej, które regulują ich przyleganie poprzez oddziaływanie z receptorami integrynowymi. Wykazano, że w zależności od tego, czy komórka jest zakotwiczona w błonie podstawnej niszy, czy kontaktuje się tylko z sąsiadującymi komórkami, będzie ona ulegała podziałowi w innej płaszczyźnie, co m.in. determinuje czy będzie to podział symetryczny czy asymetryczny (Ryc. 1). Podczas podziału symetrycznego powstają dwie identyczne komórki potomne o takich samych właściwościach jak komórka, z której pochodzą (komórka „matki”). Ten typ podziału prowadzi do zwiększenia puli komórek macierzystych. Podział asymetryczny związany jest z powstaniem jednej komórki o cechach „matki” i jednej różnicującej się. W efekcie mamy zachowaną stałą pulę komórek macierzystych, ale jednocześnie powstają komórki progenitorowe, z których powstają komórki tkanek (Molofsky i wsp. 2004, Daley i wsp. 2008, Lutolf i wsp. 2009, Bużańska i wsp. 2013).

Macierz zewnątrzkomórkowa jest substancją wypełniającą przestrzeń pomiędzy komórkami i stanowi ich swoiste rusztowanie. Składa się z białek m.in. lamininy, wimentyny, kolagenu, fibronektyny i polisacharydów np. glikozaminoglikanów (GAG). Od tych ostatnich zależy sztywność i elastyczność podłoża, na którym osadzone są komórki, a także sposób oddziaływania komórek z macierzą: specyficzne – receptorowe lub niespecyficzne – elektrostatyczne. Białka macierzy pozwalają na specyficzne wiązanie komórek do podłoża, ponieważ posiadają określone sekwencje aminokwasowe, do których mogą wiązać się receptory integrynowe (Dityatev i wsp. 2010).

Laminina (LN) jest jednym z głównych komponentów ECM. W układzie nerwowym jest składnikiem błony podstawnej, która sprzyja interakcjom neuronów i komórek glejowych. Ponadto jest niezbędna do migracji i różnicowania neuronów w rozwijającym się mózdzku i stanowi miejsce zaczepu dla wydłużających się aksonów (Liesi i wsp. 1995).

Kolagen (Col) występuje w dużej ilości w strefach neurogennych mózgu. Pełni on istotną rolę w regulowaniu sztywności ECM. W mózgu człowieka i gryzoni obecny jest głównie kolagen typu IV. W rozwijającym się układzie nerwowym lokalizuje się on wzdłuż grzebienia nerwowego. Wykazano, że może on hamować proliferację NSC i ich różnicowanie w kierunku astrocytów, wzmacniając różnicowanie neuronalne (Ali i wsp. 1998).

Proteoglikany są bardzo istotnymi składnikami ECM, zaangażowanymi w ukierunkowany wzrost neuronów i ich aksonów. Wewnątrz swojego białkowego

rdzenia zawierają liczne glikozaminoglikany, głównie proteoglikany siarczanu chondroityny (ang. *Chondroitin Sulfate ProteoGlycans*, CSPGs) lub heparanu (ang. *Heparan Sulfate ProteoGlycans*, HSPGs). Uważa się, że są one współodpowiedzialne za wiązanie FGF-2, który istotnie wpływa na proliferację NSC w niszy (Kerever i wsp. 2007).

Wykazano, że interakcje komórek rosnących obok siebie, jak również komórek z otaczającą je macierzą zewnątrzkomórkową, mają wpływ na ich losy (m.in. różnicowanie, podziały czy apoptozę). Przyleganie komórek sprzyja właściwemu formowaniu cytoszkieletu, który stanowi rusztowanie do przenoszenia cząsteczek szlaków sygnałowych (Chen i wsp. 2004) i jest czynnikiem niezbędnym do regeneracji tkanek.

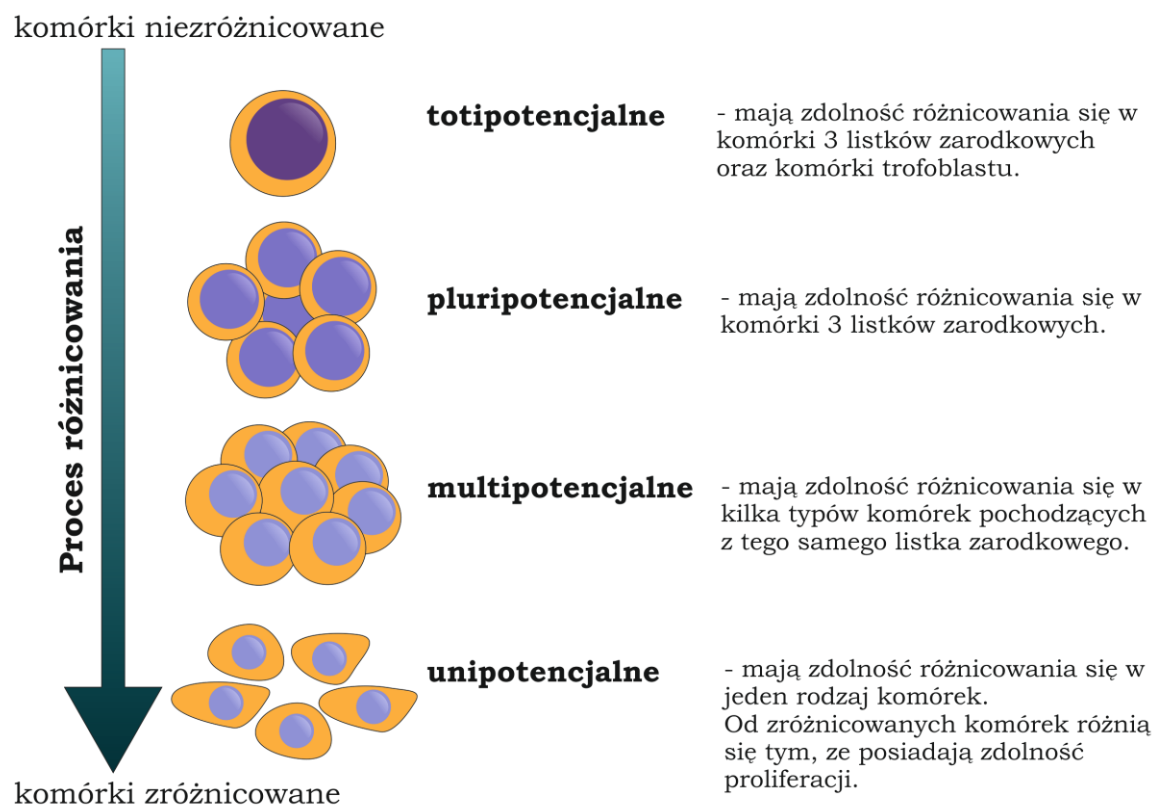
Podsumowując, losy komórek macierzystych są zależne od niszy, w której się znajdują. Fizyczne interakcje pomiędzy komórkami, a także substancje przez nie wydzielane i te dostarczone przez naczynia krwionośne spoza niszy są głównymi czynnikami wpływającymi na ich różnicowanie i podziały.

1.3. Neuralne Komórki Macierzyste (NSC)

Komórki macierzyste to niewyspecjalizowane komórki, które występują w organizmach wielokomórkowych, w tym m.in. u człowieka, charakteryzujące się zdolnością do potencjalnie nieograniczonej liczby podziałów, samoodnowy i różnicowania w różne typy komórek. Ze względu na pochodzenie możemy je podzielić na dwie główne kategorie: zarodkowe (ang. *Embryonic Stem Cells*, ESC) i tkankowe (somatyczne, zwane również “dorosłymi”) (ang. *Adult Stem Cells*, ASC). Zarodkowe komórki macierzyste występują w węzle zarodkowym blastocysty (ang. *Inner Cell Mass*, ICM), natomiast komórki somatyczne rezydują w różnych tkankach organizmu przez całe jego życie (Ciemerych 2008, Kubiak i Ciemerych 2013).

Ze względu na potencjał do różnicowania, komórki macierzyste możemy podzielić na toti-, pluri-, multi- i unipotencjalne (Ryc. 2). Komórkami totipotencjalnymi są zygota oraz blastomery w zarodkach na wczesnych etapach rozwoju przedimplantacyjnego - mogą one dać początek całemu organizmowi, w tym również tkankom pozazarodkowym. Pierwszy etap różnicowania, który skutkuje pewnym ograniczeniem potencji komórek, następuje w momencie przechodzenia stadium moruli do blastocysty. Blastocysta jest zbudowana z dwóch warstw komórek różniących się

morfologią - zewnętrznej tworzącej trofoblast, z którego powstaną błony płodowe i zarodkowa część łożyska oraz warstwy wewnętrznej budującej węzeł zarodkowy (właściwy zarodek). Komórki węzła zarodkowego mają charakter pluripotencjalny – mogą przekształcić się w komórki trzech listków zarodkowych: ekto-, mezo- i endodermy oraz pierwotne komórki płciowe. Dalszy wzrost organizmu wiąże się z różnicowaniem i specjalizacją komórek. Komórki, które mogą różnicować się w kilka typów komórek pochodzących z tego samego listka zarodkowego nazywamy multipotencjalnymi. Odgrywają one istotną rolę w utrzymaniu homeostazy tkankowej zarówno w fizjologicznych, jak i patologicznych warunkach: pozwalają zastępować wymieniane przez cały okres życia osobniczego komórki. Komórki unipotencjalne mogą różnicować się do jednego typu komórek, ale w przeciwieństwie do komórek zróżnicowanych nadal posiadają zdolność do podziałów (Ryc. 2) (Ciemerych 2008, Zhang i wsp. 2012, Mahla 2016).



Rycina 2. Schematyczne przedstawienie hierarchii rozwojowej komórek macierzystych

Neuralne komórki macierzyste to multipotencjalne, niedojrzałe komórki obecne zarówno w rozwijającym się, jak i dojrzałym Ośrodkowym Układzie Nerwowym

(OUN) (ang. *Central Nervous System, CNS*), charakteryzujące się zdolnością do samoodnowy i tzw. neuralną trójpotencją - tj. zdolnością do różnicowania w trzy główne typy komórek neuralnych: neurony, astrocyty i oligodendrocyty (Casarosa i wsp. 2014). Ponadto, pochodzące od nich komórki progenitorowe mają duży potencjał proliferacyjny i migracyjny, dzięki czemu mogą docierać do miejsc uszkodzenia i uzupełniać ubytki tkanki (Brousse i wsp. 2015).

1.3.1. Metody otrzymywania Neuralnych Komórek Macierzystych

Jedną z metod otrzymywania NSC jest ich izolacja z rozwijających się zarodków i płodów (np. po spontanicznym poronieniu). Jej zaletą jest fakt, że są to komórki pierwotne, niezróżnicowane o potencjalnie dużej zdolności do proliferacji. Jednakże liczba NSC uzyskanych przy takiej procedurze jest ograniczona. Ponadto spontaniczne poronienie jest często wynikiem wystąpienia wad rozwojowych płodu, które mogą być związane z mutacjami genetycznymi, obecnymi również w izolowanych NSC. Teoretycznie, możliwe jest uzyskanie NSC w wyniku indukowanego różnicowania ESC, pochodzących z rozwijającej się blastocysty, jednakże ze względów etycznych stanowią one materiał o ograniczonej dostępności. Rozwiązaniem tego problemu mogłoby być pozyskiwanie NSC w wyniku różnicowania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC) (Denham i Dottori, 2011). Komórki wyjściowe można pozyskiwać z łatwo dostępnych źródeł (praktycznie z każdej tkanki organizmu), reprogramować i różnicować. Jednakże technicznie wykonanie takiej procedury, która byłaby z jednej strony bezpieczna (nie integracyjna), a z drugiej wystarczająco wydajna, ciągle wymaga zaawansowanych badań, nad którymi pracuje wiele laboratoriów na świecie (Augustyniak i wsp. 2014). Inną techniką jest pozyskiwanie NSC z dorosłego mózgu. Niestety ze względu na lokalizację NSC, nie jest możliwa ich bezpieczna izolacja z nisz endogennych (Roszek i Komoszyński 2008, Mahla 2016). Dlatego też poszukuje się alternatywnych metod pozyskiwania NSC.

Ostatnio popularna stała się technika uzyskiwana indukowanych neuralnych komórek macierzystych (ang. *induced Neural Stem Cell, iNSC*) w wyniku bezpośredniej transdiferencjacji z fibroblastów i innych komórek zróżnicowanych (Ruggieri i wsp. 2014). Jest to technika polegająca na bezpośredniej konwersji fenotypowej z pominięciem reprogramowania do stanu pluripotencjalności (ang.

phenotypic conversion). Metoda ta jest bardziej wydajna i szybsza, niż uzyskiwanie i różnicowanie iPSC, co więcej, poprzez skrócenie czasu reprogramowania i zmniejszenie liczby stosowanych związków, potencjalnie niesie ze sobą mniejsze ryzyko mutacji, wiąże się jednak zwykle z zastosowaniem wektorów wirusowych, co stwarza wątpliwości dotyczące bezpieczeństwa i uniemożliwia zastosowanie w klinice (Liu i wsp. 2012A).

Alternatywną metodą jest izolacja komórek pochodzących z tkanek płodu (krwi pępowinowej, sznura pępowinowego, tkanek łożyska). Są one często bardziej pierwotne niż te pochodzące z nisz w dojrzałym organizmie i dają większe możliwości regeneracyjne. Z ludzkiej krwi pępowinowej wyprowadzono stabilną linię neuralnych komórek macierzystych (HUCB-NSC), która jest przedmiotem badań niniejszej rozprawy (Bużańska i wsp. 2002, 2006). Z mezenchymalnych komórek macierzystych (ang. *Mesenchymal Stem Cells*, MSC) izolowanych z Galarety Wharton'a (ang. *Wharton's Jelly*, WJ) i hodowanych w odpowiednich warunkach uzyskano komórki o fenotypie neuralnym, charakteryzujące się wysokim potencjałem proliferacyjnym, ekspresją czynników neurotroficznych i obecnością markerów typowych dla NSC (Drela i wsp. 2016).

Zaletą stosowania komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej i sznura pępowinowego jest fakt, iż są stosunkowo łatwe w uzyskaniu, przechowywaniu, posiadają wysoki potencjał proliferacyjny i istnieje możliwość ich zastosowania do przeszczepów autologicznych. Ponadto, w tkankach płodu, jest ponad 8 razy więcej KM niż np. w szpiku kostnym czy krwi obwodowej i są one mniej wrażliwe na substancje toksyczne pochodzące ze środowiska (Domańska-Janik i wsp. 2008, Bużańska i wsp. 2009A, Bużańska i wsp. 2010). Dodatkowo izolacja KM z tkanek płodu nie jest obciążona wątpliwościami natury etycznej (Machaliński i wsp. 1998, Hordyjewska i wsp. 2015).

1.3.2. Linia neuralnych komórek macierzystych wyprowadzona z krwi pępowinowej (HUCB-NSC)

Linia HUCB-NSC została otrzymana w IMDiK PAN z frakcji mononuklearnej ludzkiej krwi pępowinowej pozbawionej komórek hematopoetycznych (CD34+). Prowadzono selekcję komórek nieprzylegających, które przenoszono do pożywki różnicującej w obecności EGF, dzięki czemu udało się uzyskać frakcję komórek o

charakterze neuralnym (Bużańska i wsp. 2001, 2002). Wykazano, że komórki te charakteryzują się stabilnym kariotypem, zdolnością do nieograniczonego wzrostu w warunkach *in vitro* i różnicowania w trzy podtypy komórek neuralnych o charakterze neuronów, astrocytów i oligodendrocytów (Bużańska i wsp. 2006).

Komórki linii HUCB-NSC mogą być utrzymywane w hodowli na różnych etapach rozwoju (Ryc. 3):

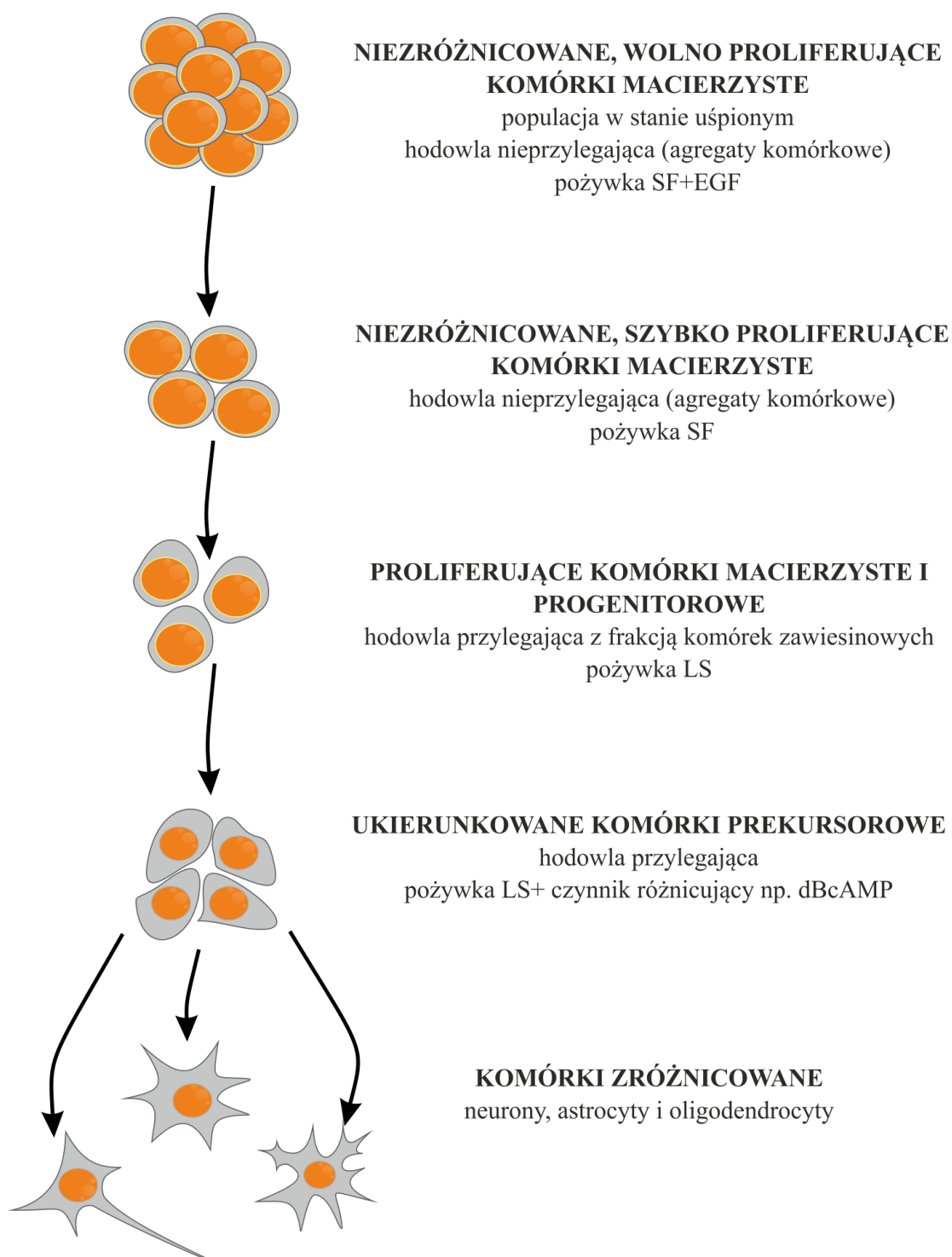
- niezróżnicowane, wolno proliferujące komórki macierzyste rosnące w postaci nieprzylegających agregatów komórkowych, hodowane w pożywce bezsurowiczej z dodatkiem EGF (SF+EGF),
- niezróżnicowane, szybko proliferujące komórki macierzyste rosnące w pożywce w postaci przylegających agregatów komórkowych, hodowane w bezsurowiczej pożywce bez EGF (SF),
- proliferujące komórki macierzyste i progenitorowe – rosnące w hodowli zawierającej frakcję komórek przylegających i mniej liczną frakcję komórek nieprzylegających, hodowane w pożywce z małą zawartością surowicy (2% FBS) (LS),
- ukierunkowane komórki prekursorowe – przylegające, hodowane w pożywce z małą zawartością surowicy i różnicowane za pomocą czynników indukujących różnicowanie, np. dBcAMP (LS+dBcAMP).

W warunkach wzrostu komórek w zawieszynie (hodowla nieprzylegająca w pożywce bezsurowiczej) HUCB-NSC wykazują zdolność do tworzenia neurosfer – regularnych agregatów komórkowych tworzących trójwymiarową strukturę o określonej budowie (Bużańska i wsp. 2005).

Hodowla HUCB-NSC w pożywce zawierającej 2% surowicy pozwala uzyskać dwie frakcje komórek. Większość z nich to komórki przylegające do dna naczynia hodowlanego, tworzące jednowarstwową heterogenną populację, charakteryzujące się obecnością wypustek i ekspresją białek typowych dla wczesnych progenitorów neuralnych. Drugą, mniej liczną frakcję, stanowią komórki niezróżnicowane unoszące się w pożywce hodowlanej. Hodowla przylegająca zapewnia komórkom lepszą ekspozycję na cząsteczki sygnałowe, a w przypadku pokrycia podłoża substancją adhezyjną (np. białkami ECM), pozwala na lepszą organizację cytoszkieletu, co jest niezbędne do właściwego różnicowania NSC.

Dalsze różnicowanie HUCB-NSC do komórek charakteryzujących się ekspresją białek typowych dla neuronów, astrocytów i oligodendrocytów może być przeprowadzone poprzez dodanie do pożywki hodowlanej czynników indukujących różnicowanie w określonym kierunku np. w kierunku neuronalnym poprzez zastosowanie kwasu retinowego (ang. *Retinoic Acid*, RA), neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego (ang. *Brain Derived Neurotropic Factor*, BDNF) lub dwumaślanu cyklicznego AMP (ang. *diButyryl cyclic Adenosine MonoPhosphate*, dBcAMP) (Bużańska i wsp. 2002, 2003, 2005, 2006A, Jurga i wsp. 2009).

Wcześniejsze badania prowadzone w naszym zespole dowiodły, że jedynie warunki trójwymiarowe (struktury rusztowań 3D porośnięte komórkami) pozwoliły na uzyskanie w hodowli HUCB-NSC funkcjonalnych neuronów zdolnych do generowania spontanicznych potencjałów czynnościowych na mikromacierzach wieloelektrodowych (Jurga i wsp. 2009). Biorąc pod uwagę przytoczone powyżej wyniki, zasadnym wydaje się być stosowanie hodowli trójwymiarowej w badaniach dotyczących rozwoju i różnicowania HUCB-NSC.



Rycina 3. Schemat przedstawiający hierarchię rozwoju HUCB-NSC (na podstawie Bużańska i wsp. 2005, zmodyfikowane).

1.4. Różnicowanie Neuralnych Komórek Macierzystych

Mechanizmy odpowiedzialne za indukują samoodnowy i różnicowanie komórek macierzystych rezydujących w niszach naszego organizmu, pomimo, iż są intensywnie badane w wielu laboratoriach na świecie, nie są do końca poznane. Zrozumienie tych mechanizmów pozwoliłoby na odtworzenie procesu normalnego/fizjologicznego rozwoju organizmu i odkrycie co powoduje, że komórki ulegają transformacji nowotworowej.

Dotychczasowe badania wykazały, że proces różnicowania komórek składa się z wielu etapów, podczas których aktywowane są kolejne grupy genów typowe dla danego stadium rozwoju komórki. Niektóre z nich pobudzają różnicowanie w określonym kierunku, a inne je hamują. Ekspresja tych genów zależna jest od wielu czynników, m.in. obecności cząsteczek uwalnianych przez sąsiadujące komórki i interakcji komórka-komórka, dostępności tlenu i dwutlenku węgla, wielkości, kształtu i elastyczności środowiska, w którym rosną, modyfikacji epigenetycznych i wielu innych.

Decyzja czy komórka zachowa swój potencjał do różnicowania i zdolność do samoodnawiania, czy rozpocznie różnicowanie zależy od aktywności wielu szlaków sygnałowych i równowagi pomiędzy nimi. Uważa się, że za utrzymanie populacji NSC w niszach w mózgu odpowiadają przede wszystkim szlaki: Notch, Wnt i Hedgehog (Ahn i Joyner 2005).

Szlak sygnałowy Notch

Szlak sygnałowy Notch reguluje głównie procesy związane z proliferacją i różnicowaniem komórek. Aktywność tego szlaku jest niezbędna do utrzymania zdolności do samoodnawiania różnych typów komórek macierzystych w ich niszach (m.in. HSC i NSC) (Calvi i wsp. 2003, Hitoshi i wsp. 2002). Aby mogło dojść do różnicowania NSC, aktywność szlaku sygnałowego Notch musi być zahamowana przez białko NUMB (Spana i Doe, 1996). Białko to pełni również kluczową rolę w regulacji podziałów asymetrycznych, dzięki którym powstają komórki niezbędne do budowy tkanek i narządów m.in. podczas neurogenezy (Rhyu i wsp. 1994). Receptor Notch jest pobudzany przez bezpośredni kontakt pomiędzy komórkami - ligandy znajdujące się na jednej komórce łączą się z receptorami Notch znajdującymi się na drugiej. Komórki

posiadające na swojej błonie powierzchniowej ligandy dla receptora Notch (np. cząsteczki Jagged) mogą w sąsiadujących z nimi komórkach, włączać lub wyłączać sygnalizację Notch, a co za tym idzie regulować ich decyzje rozwojowe. Uważa się, że właśnie dzięki temu mechanizmowi możliwa jest właściwa organizacja komórek w tkankach (Greenwald 2012). Szlak sygnałowy Notch jest zaangażowany w proces różnicowania i formowania wielu tkanek w okresie zarodkowym i dorosłym życiu. Wykazano, że pełni on istotną rolę m.in. w regulacji losu endotelialnych komórek macierzystych i w angiogenezie (Liu i wsp. 2003), a w niszach neuralnych komórek macierzystych odpowiada za utrzymanie odpowiedniej równowagi pomiędzy ilością NSC i NPC (neuralne komórki progenitorowe, ang. *Neural Progenitor Cells*, NPCs) (Aguirre i wsp. 2010). Znana jest również funkcja Notch w aktywacji gliogenezy (Morrison i wsp. 2000).

Szlak sygnałowy Wnt

Szlak sygnałowy Wnt reguluje różnicowanie i migracje komórek. Podczas rozwoju zarodkowego odpowiada za właściwy przebieg organogenezy i rozwój układu nerwowego. Wykazano istnienie dwóch ścieżek szlaku Wnt, klasycznej (kanonicznej) – związanej z β -kateniną oraz ścieżki nieklasycznej, która działa antagonistycznie do szlaku klasycznego (Komiya i Habas 2008). Cząsteczki Wnt są glikoproteinami wydzielanymi pozakomórkowo, oddziałującymi z macierzą zewnątrzkomórkową (z glikozaminoglikanami) i wywołującymi odpowiedź w komórkach poprzez wiązanie się z receptorami powierzchniowymi z rodziny Frizzled (Fz) (Kato i Kato, 2007). Wykazano, że szlak Wnt przez β -kateninę może wpływać na proliferację i zdolność do samoodnowy w niektórych typach komórek macierzystych. Nadekspresja tej ostatniej sprzyjała zwiększeniu puli komórek progenitorowych w układzie nerwowym (Chen i Walsh, 2002). Uważa się, że szlak niekanoniczny jest on odpowiedzialny za segregację komórek podczas tworzenia listków zarodkowych (Veeman i wsp. 2003). Wnt7a działając w szlaku niezależnym od β -kateniny, jest zaangażowany we wzrost aksonów i formowanie synaps. Z drugiej strony wykazano udział Wnt7a w utrzymaniu populacji NSC w ich niszy poprzez zahamowanie cyklu komórkowego i regulację samoodnawiania, jest również istotny dla prawidłowego przebiegu wczesnych etapów neurogenezy (Qu i wsp. 2013).

Szlak sygnałowy Hedgehog

Szlak sygnałowy *Hedgehog* to konserwatywny mechanizm regulujący rozwój embrionalny ssaków (Roszek i Komoszyński 2008). Aktywowany jest przez jedno z trzech białek: Sonic hedgehog (Shh), Desert hedgehog (Dhh) lub Indian hedgehog (Ihh), spośród których najlepiej poznane jest Shh. Szlak Sonic hedgehog jest niezbędny do utrzymania puli neuralnych komórek progenitorowych podczas rozwoju układu nerwowego i w postnatalnym kresomózgowiu (Machold i wsp. 2003). Shh wpływa na stopień proliferacji progenitorów neuralnych *in vivo* i *in vitro* (Lai i wsp. 2002). Co ciekawe, wykazano że hipoksja powoduje zwiększenie ekspresji *Shh* w progenitorach neuralnych i neuronach, co jest związane ze zwiększoną proliferacją tych pierwszych (Sims i wsp. 2009).

Szlak sygnałowy BMP

Białka morfogenetyczne kości (ang. *Bone Morphogenetic Protein*, BMP) należą do nadrodziny TGF β (transformującego czynnika wzrostu beta, ang. *Transforming Growth Factor β*). Szlak sygnałowy BMP może przebiegać drogami kanonicznymi – z udziałem białek SMAD, lub niekanonicznymi, które są od nich niezależne (Wang i wsp. 2014, Dubiel i wsp. 2015). Aktywność szlaku sygnałowego może być bezpośrednio hamowana przez wiązanie jednego z antagonistów: białka noggin, chordyny (ang. *Chordin*), folistatyny (ang. *Follistatin*), neurogesyny-1 (ang. *Neurogesin-1*) lub innych (Bond i wsp. 2012).

Białka z rodziny BMP regulują proliferację, różnicowanie i apoptozę podczas rozwoju zarodkowego, a w rozwiniętych organizmach odpowiadają za homeostazę tkankową. Wykazano również, że biorą udział w gojeniu ran oraz odpowiedzi immunologicznej dorosłych organizmów (Dubiel i wsp. 2015).

BMP są obecne w dużych ilościach w rozwijającym się – zarodkowym i płodowym, ale także w dorosłym układzie nerwowym i odgrywają kluczową rolę w wielu procesach komórkowych, w tym różnicowaniu i dojrzewaniu NSC. Wykazano, że ekspresja BMP jest ściśle regulowana i wykazuje zróżnicowany wzorzec czasowy i przestrzenny, dzięki czemu może wywierać różne, często przeciwne, efekty na rozwijający się układ nerwowy (Bond i wsp. 2012). W układzie nerwowym szczególną rolę odgrywają BMP4 i BMP7, które blokują indukcję szlaku nerwowego w ektodermie.

Ich aktywność w komórkach ektodermy przyczynia się do tworzenia naskórka. Natomiast ich zablokowanie przez noggin, chordinę i folistatynę powoduje odblokowanie różnicowania neuroektodermalnego (Smith i Harland, 1992; Smith i wsp. 1993, Lamb i wsp. 1993, Lamb i wsp. 2001). Ponadto BMP4 reguluje formowanie mózgowia poprzez indukcję apoptozy komórek grzebienia nerwowego (Graham i wsp. 1994).

Indukcja różnicowania neuralnego jest z jednej strony efektem zablokowania aktywności szlaku BMP, a z drugiej działania szlaków związanych z czynnikami wzrostu - FGF i IGF (Insulinopodobny Czynniki Wzrostu, ang. *Insulinlike Growth Factor*). Sygnalizacja FGF hamuje ekspresję BMP4 i BMP7, umożliwiając komórkom różnicowanie neuralne (Ishimura i wsp. 2000).

Szlak BMP jest zaangażowany również w regulację przejścia pomiędzy neuro- i gliogenezą. Na początkowym etapie różnicowania neuralnego BMP sprzyja neurogenezie powodując różnicowanie NSC w kierunku neuronalnym. Uważa się, że BMP4 poprzez aktywację szlaku sygnałowego ERK (ang. *Extracellular signal-Regulated Kinases*) może indukować ekspresję neuronalnej β TUBULINY II (TUJ1) (Moon i wsp. 2009). Ponadto wykazano, że ekspresja NEUROGENINY1 (NGN1), proneuralnego czynnika transkrypcyjnego, reguluje wpływ szlaku sygnałowego BMP na NSC. Podczas neurogenezy wysoka ekspresja NGN1 sprzyja proneuralnemu działaniu BMP (Ma i wsp. 1996). Wraz z postępującą neurogenezą, NGN1 hamuje indukowane przez BMP różnicowanie w kierunku astrocytarnym (zablokowanie ekspresji GFAP) i dopiero, gdy jej ilość znacznie się zmniejszy, dochodzi do odblokowania ekspresji GFAP i przejścia z neurogenezy do gliogenezy (Sun i wsp. 2001). Wykazano, że nadekspresja BMP7 w mózgu zmniejsza proliferację i spowalnia neurogenezę. Równocześnie zahamowanie tego szlaku przez Noggin zmniejsza liczbę astrocytów tworzonych z progenitorów znajdujących się w strefie neurogennej komór mózgu i promuje ich różnicowanie neuronalne (Lim i wsp. 2000).

1.5. Hodowla *in vitro* - wpływ czynników środowiskowych

1.5.1. Rusztowania trójwymiarowe

Już w 1933 roku pojawiła się pierwsza koncepcja zastosowania "sztucznych materiałów" jako nośników komórkowych i przeszczepienia ich do żywego organizmu. Biscgelie stworzył hodowlę mysich komórek nowotworowych zamkniętych w biopolimerowej błonie, którą następnie przeszczepił do jamy brzusznej kurzych embrionów. Doświadczenie to uważa się za początek rozwoju inżynierii tkankowej (Biscgelie 1933). Kolejne badania pozwoliły opracować konstrukty złożone z komórek beta trzustki rosnących na syntetycznych kapilarach, które wydzielają insulinę w odpowiedzi na zmiany stężenia glukozy w pożywce hodowlanej (Chick i wsp. 1975). Udało się również zastosować fibroblasty hodowane na kolagenowych rusztowaniach w leczeniu rozległych poparzeń (Burke i wsp. 1981). Obecnie prowadzi się wiele prób zastosowania połączenia komórek macierzystych i trójwymiarowych rusztowań w leczeniu chorób, regeneracji i/ lub zastępowaniu narządów. Dotyczy to komórek pochodzących z różnych listków zarodkowych, będących na różnych stadiach zróżnicowania i posiadających odmienny potencjał proliferacyjny.

Termin inżynieria tkankowa został po raz pierwszy użyty podczas warsztatów National Science Foundation w 1988 roku i odnosił się do możliwości zastosowania zasad i metod inżynierii i nauk o życiu do zrozumienia podstawowych zależności pomiędzy strukturą a funkcją normalnych i patologicznych tkanek ssaków, a także do rozwoju substytutów biologicznych, które przywrócą, utrzymają lub poprawią funkcję tkanek (Langer i Vacanti, 2016). Najważniejszym celem inżynierii tkankowej jest wytwarzanie *in vitro* struktur tkankowych o charakterze ochronnym i regeneracyjnym. Cel ten próbuje się osiągnąć łącząc szybki postęp w dziedzinie biologii komórek macierzystych i badań molekularnych z postępem w dziedzinie inżynierii materiałowej i bioinformatycznej. Stosowane są różne strategie tworzenia konstruktów komórkowo-biomateriałowych i ich hodowli. Polegają one na nasiewaniu komórek na już wytworzone rusztowania (strategia „Top-down”), albo na otrzymywaniu modułów biomateriałowo-komórkowych na zasadzie agregacji lub drukowania struktury tkanki biomateriałem razem z zawieszonymi komórkami (strategia „Bottom-up”) (Nichol i Khademhosseini, 2009). W efekcie zasiedlone komórkami rusztowanie w określonych warunkach *in vitro* ma spełniać rolę niszy przypominającej warunki naturalne

(biomimetyczne) dla kompetentnych terapeutycznie komórek, natomiast przeszczepione do tkanki ma spełniać funkcję strukturalną i regeneracyjną.

Podczas projektowania rusztowań istotne są takie cechy jak biokompatybilność i biodegradowalność biomateriału, brak cytotoksyczności, topografia powierzchni, na której będą rosły komórki, a także twardość i właściwości przewodzące materiału. Istotne są również cechy związane z obróbką rusztowania: powtarzalność tworzonych struktur (zarówno przestrzenna jak i chemiczna), łatwość manipulowania i sterylizacji. Idealne rusztowanie powinno wspierać przyleganie komórek, ich przerastanie w głąb struktury rusztowania. Właściwości mechaniczne powinny być zbliżone do tkanki, do której rusztowanie ma być przeszczepione. Powinno wspierać angiogenezę i tworzenie odpowiedniej sieci nowych naczyń krwionośnych (wystarczającej gęstości, aby zaopatrzyć odbudowywaną tkankę). Nie powinno również powodować odpowiedzi immunologicznej, a więc konieczności stosowania leków immunosupresyjnych (Sarnowska i wsp. 2013, Mahla 2016).

Do konstrukcji rusztowań stosuje się dwa typy materiałów: naturalne i syntetyczne. Do najczęściej stosowanych biomateriałów naturalnych możemy zaliczyć: kolagen, włókna jedwabiu, alginiany, chitozan, keratynę, elastynę (Chhabra i wsp. 2016, Pietrucha 2015, Konop i wsp. 2017, Pietrucha i wsp. 2017) i decelularyzowane tkanki np. pozbawiona nabłonka błona owodniowa (Feng i wsp. 2014) lub nanerwie (łac. *epineurium*) izolowane z nerwu biodrowo-pachwinowego (Klimczak i wsp. 2017). Wśród materiałów syntetycznych należy wymienić: poliestry i ich kopolimery, poliuretany, polifosfazeny, poliwęglany, poliestroamidy, poliglikolidy, a także ceramiczne: hydroksyapatyty, bio szkła (Gunatillake i wsp. 2006, Krishna i wsp. 2016).

Naturalne biomateriały mają tę przewagę nad materiałami syntetycznymi, że łatwo integrują się z tkanką, są biodegradowalne, nie są też z reguły cytotoksyczne, zawierają naturalne składniki macierzy zewnątrzkomórkowej niszy komórkowej - przez co posiadają aktywność biologiczną i wpływają na procesy komórkowe. Są one jednak trudniejsze w manipulacji, poważne problemy stwarza ich sterylizacja, a złożona, często niepowtarzalna struktura utrudnia ocenę, który czynnik wywołał określoną odpowiedź komórkową. Dodatkowo komponenty białkowe pochodzące od innych organizmów mogą wywołać odpowiedź układu immunologicznego. Z drugiej strony, materiały syntetyczne pozwalają na bardzo precyzyjne projektowanie struktury przestrzennej rusztowań, łatwiej jest wyeliminować ich ewentualne zanieczyszczenia już na etapie

produkcji, są łatwiejsze w sterylizacji, produkcji na dużą skalę, ale bardzo często nie stanowią atrakcyjnego podłoża do wzrostu i proliferacji komórek, co indukuje potrzebę ich dodatkowej funkcjonalizacji (Rao i Winter, 2009, Saha i wsp. 2007). Funkcjonalizacja może polegać na fizycznym oddziaływaniu z rozpuszczalnymi cząsteczkami sygnałowymi lub modyfikacji chemicznej materiału, głównie przez przyłączenie cząsteczek odpowiedzialnych za przyleganie komórek (ang. *Adhesion Molecules*, AMs) albo samych sekwencji peptydowych aktywnie wiążących receptory integrynowe (Willerth i Sakiyama-Elbert, 2007). Problemem związanym z użyciem sztucznych biomateriałów jest też często wywoływana przez nie reakcja zapalna, która wynika z tego, że w związku z ich rozkładem uwalniane są związki drażniące tkankę, w której są umieszczone (Gunatillake i wsp. 2006).

1.5.1.1. Właściwości fizykochemiczne rusztowań: wpływ na różnicowanie komórek macierzystych

Materiał, z którego zbudowane jest rusztowanie stanowi dla komórki sygnał chemiczny, natomiast jego kształt i właściwości fizykochemiczne są informacją biofizyczną. Możemy tu uwzględnić wpływ takich czynników jak nanotopografia, mikrogeometria, siły mechaniczne, sztywność i chropowatość biomateriału, rozpuszczalność, zdolność do przewodzenia ciepła czy prądu. Niezwykle istotny jest też stosunek powierzchni, którą mogą porastać komórki do objętości rusztowania. Wszystkie te czynniki wpływają na losy komórek (Krishna i wsp. 2016). Właściwości mechaniczne materiału zależą przede wszystkim od jego składników, zawartości wody i struktury, które regulują między- i wewnątrzcząsteczkowe siły i naprężenia. Właściwości te są najczęściej modyfikowane dzięki zmianom w składzie, przewodnictwie, obróbce termicznej czy porowatości (Saha i wsp. 2007).

Niektóre procesy komórkowe, takie jak: proliferacja, różnicowanie czy apoptoza, zależą od specyficznej komórkowo lokalizacji w tkance, co jest związane z jej określoną geometrią. Badania na KM oparte na takich obserwacjach pozwoliły stwierdzić, że te same komórki wysiane na struktury o różnej geometrii różnicują się w inne podtypy komórek. Wydaje się, że mogą one zarówno wspierać, jak i blokować sygnały stymulujące komórki do różnicowania (np. te związane z działaniem czynników wzrostu i/lub cytokin) (Krishna i wsp. 2016, Saha i wsp. 2007, Zychowicz i wsp. 2012).

Podczas wytwarzania rusztowań stosuje się różne typy topografii m.in. gąbki zawierające pory, otwarte rowki, zamknięte kanały (lamelle), nanorurki, nanowłókna, które w różny sposób oddziałują na komórki. Zwraca się tu uwagę na oddziaływanie cytoszkieletu komórek z rusztowaniem, a także na indukowaną przez geometrię rusztowania interakcję komórka-komórka (Krishna i wsp. 2016).

Siły mechaniczne działające na komórki są uważane za jeden z ważniejszych czynników kształtujących niszę. Błona komórkowa, dopasowując się do kształtu nanostruktury rusztowania, może powodować zwiększenie napięcia wewnątrzkomórkowego, co z kolei może skutkować przebudową znajdującego się pod nią cytoszkieletu, zmieniając tym samym morfologię i procesy życiowe komórki (Ahmed i wsp. 2007). Uważa się, że za mechanotransdukcję sygnału może odpowiadać kilka szlaków komórkowych m.in. MAPK, PI3K/Akt, RhoA/ROCK, Wnt/ β -katetnina i TGF- β , których aktywność jest w dużej mierze zależna od interakcji komórki z otaczającym ją środowiskiem (Krishna i wsp. 2016). Obecnie nie są jeszcze znane mechanizmy odpowiedzialne za przetworzenie informacji biofizycznej na sygnał wewnątrzkomórkowy, ale istotny wydaje się mechanizm związany z zależną od integrzyn adhezją komórek. Układ przestrzenny dostępnych dla komórki miejsc wiązania znajdujących się na cząsteczkach adhezyjnych rusztowania/ECM jest rozpoznawany przez komórki, wpływając na transmisję sygnału z rusztowania/ECM, przez powierzchniowe cząsteczki adhezyjne na cytoszkielet komórki (Guilak i wsp. 2009, Dalby i wsp. 2014). Wydaje się, że najistotniejsze w kształtowaniu losu komórki są wielkość, kształt i elastyczność powierzchni przylegania.

W przypadku komórek HUCB-NSC hodowanych na powierzchniach biofunkcyjnych (domenach) pokrytych białkami macierzy zewnątrzkomórkowej, wykazano zależność odpowiedzi komórkowej od kształtu powierzchni. Cienkie linie (10 μm) mikrodrukowane fibronektyną promowały wydłużanie i różnicowanie HUCB-NSC. Zaobserwowano zwiększoną ekspresję białek β -TUBULINY III i MAP2 – markerów typowych dla różnicowania neuronalnego. Natomiast komórki hodowane na małych domenach punktowych (10 x 10 μm) pozostawały niezróżnicowane (Zychowicz i wsp. 2012). Większe domeny o charakterze kwadratów (120 x 120 μm) pokryte fibronektyną promowały różnicowanie neuralne, przy czym dodatkowe linie łączące kwadraty kierunkowały wzrost aksonów (Bużańska i wsp. 2009). MSC hodowane na małych powierzchniach (1,000 μm^2) bez względu na ich kształt różnicowały się w kierunku tkanki tłuszczowej, natomiast przy większych (2,500 i 5,000 μm^2) kierunek

różnicowania był bardziej zależny od kształtu powierzchni, do której przylegały. Dodatkowym czynnikiem wpływającym na komórki jest elastyczność podłoża. W zależności od elastyczności podłoża MSC mogą różnicować się w neurony (<1 kPa), adipocyty (1-7 kPa) lub tkankę kostną (>20 kPa). Małe koła sprzyjają adipogenezie, a powierzchnia zbliżona kształtem do prostokątów osteogenezie (Harris i wsp. 2014). Badania prowadzone na ludzkich ESC wykazały, że zastosowanie elastycznych hydrożeli promuje ich pluripotencję i samoodnawianie (Li i wsp. 2007). Trójwymiarowe pianki zrobione z grafenu wpływają w różny sposób na odpowiedź NSC w zależności od ich elastyczności. Twardsze (64kPa) rusztowania sprzyjały przyleganiu komórek (podwyższoną ekspresję integryn i winkuliny) i ich proliferacji (zwiększenie liczby komórek Ki67-pozytywnych). Równocześnie nie wykazano zmian w ekspresji NESTYNY, co sugeruje, że twardsze rusztowania, w porównaniu z miękkimi (30kPa), promują utrzymanie NSC w stadium niezróżnicowanym (Ma i wsp. 2016). Ciekawe wyniki uzyskano stosując rusztowania wykonane z fotopolimeryzowanego chitozanu z metakrylamidem (ang. *photopolymerizable MethacrylAmide Chitosan*, MAC). Zaobserwowano, że elastyczność około 3,5 kPa promuje proliferację NSC. Różnicowanie w kierunku neuronalnym było najwydajniejsze na miękkich (<1 kPa), astrocytarnym na średnich (1-3,5 kPa), a oligodendrocytarne na najtwardszych (> 7 kPa) rusztowaniach (Leipzig i Shoichet 2009). W każdym z tych przypadków rusztowania były w zakresie "miękkich" wartości kPa w porównaniu z komórkami innych tkanek (np. > 100 kPa dla komórek mięśniowych i powyżej 1000 kPa dla osteoblastów) (Butcher i wsp. 2009).

W rusztowaniach o charakterze porowatym, poza w/w właściwościami biomateriału, wielkość porów ma duże znaczenie w regulacji losów KM. Kształt powierzchni 3D, na której rosną komórki powinien być dostosowany do ich morfologii i funkcji fizjologicznych. Odpowiedniej wielkości pory w rusztowaniu są również potrzebne, aby zapewnić swobodny przepływ pożywki hodowlanej, co jest związane z dostawą tlenu i substancji odżywczych. Uważa się, że porowatość materiałów poprawia przyleganie komórek, które na zbyt gładkiej powierzchni porastają głównie krawędzie rusztowania. Pory możemy podzielić ze względu na ich wielkość na: nano-pory (<100nm), mikro-pory (100nm - 100µm) i makro-pory (>100 µm). Stwierdzono, że nano-pory wspierają formowanie włókien kolagenowych i tworzenie ECM, natomiast makro-pory regulują dystrybucję komórek w rusztowaniu i umożliwiają ich migrację (Bružauskaitė i wsp. 2016). Ponadto wykazano, że wielkość porów wpływa na

różnicowanie komórek. Mniejsze pory (0,2–1 μm) sprzyjają utrzymaniu macierzystości ludzkich osteoblastów, podczas gdy ich powiększenie (5,0–8,0 μm) promuje ich różnicowanie (Lee i wsp. 2004).

Nie tylko wielkość, ale też kształt porów może mieć wpływ na różnicowanie komórek. Wykazano, że podłużne pory (przypominające kształtem rurki) promują ukierunkowany wzrost aksonów. Dla ich wzrostu optymalne wydają się pory o długości sięgającej 750 μm lub nawet dłuższe (Hausner i wsp. 2007). Ponadto regulując średnicę rurki można otrzymać współhodowlę neuronów i komórek Schwanna, które migrują przez podłużne pory wraz z aksonami, co promuje wydłużanie aksonów (Pawar i wsp. 2011).

Od wielu lat trwają próby konstrukcji takich systemów i materiałów, które z jednej strony wspierałyby naturalny proces regeneracji, a z drugiej umożliwiłyby dostarczenie i adaptację komórek macierzystych w miejscu uszkodzenia. Jednakże przeszczep do OUN jest stosunkowo skomplikowany, ze względu na utrudnioną dostępność miejsca uszkodzenia, wrażliwość na urazy mechaniczne i niedotlenienie a także silną odpowiedź immunologiczną (Sarnowska i wsp. 2013, Bużańska i wsp. 2013).

Badania prowadzone przez ostatnie kilkanaście lat wykazały, że hodowle komórkowe, w których stosuje się trójwymiarowe rusztowania oferują bardziej fizjologiczne modele badań. Uważa się, że mogą one wypełnić lukę pomiędzy dotychczasowymi dwuwymiarowymi hodowlami *in vitro*, a badaniami *in vivo* z wykorzystaniem zwierząt. Stanowią doskonały sposób badań nad zachowaniem się komórek, formowaniem tkanek i ich fizjologią, a także wpływem niszy na los komórek. Są też dobrym narzędziem do badań przesiewowych leków. Nie ulega wątpliwości, że dzięki możliwości wszechstronnej manipulacji (składu, struktury, bioaktywności) stanowią wielką nadzieję medycyny regeneracyjnej (Cosson i wsp. 2015).

1.5.2. Znaczenie stężenia tlenu w hodowli komórek macierzystych

Wewnątrzkomórkowe stężenie tlenu u ludzi jest utrzymywane w stosunkowo ścisłym zakresie, typowym dla danej tkanki. Pomiedzy tkankami stężenie to waha się i może osiągać wartości od około 16% O_2 (110 mmHg) w pęcherzykach płucnych do 3% (>20mmHg) i mniej w niektórych obszarach serca, nerek czy mózgu, gdzie może spadać nawet do 0,55% (4.1 mmHg) w śródmózgowiu. W naturalnych niszach

neuralnych komórek macierzystych w mózgu fizjologiczne stężenie tlenu jest wielokrotnie niższe od atmosferycznego i waha się w granicach 0,5 - 5% (De Filippis i Delia 2011, Erecińska i Silver 2001). Fizjologiczne stężenie tlenu typowe dla danej tkanki odzwierciedla pośrednio jej funkcje i związane z pełnioną funkcją zapotrzebowanie na tlen. Komórki wytworzyły wiele mechanizmów obronnych zarówno przed zbyt małą, jak i nadmierną ilością tlenu.

Wykazano, że embriogeneza jest w znacznym stopniu zależna od gradientu stężenia tlenu. Zmierzone, że tlen jest w stanie dyfundować w tkankach na głębokość około 150 μm (Folkman i wsp. 2000). Na tej podstawie można łatwo wywnioskować, że przed rozwojem układu krwionośnego dostarczanie tlenu w głąb rozwijającego się zarodka jest utrudnione i opiera się na wspomnianej wyżej dyfuzji, a co za tym idzie rozwój ssaków przebiega w środowisku o ograniczonej dostępności tlenu.

W macicy, w której rozwija się płód stężenie tlenu waha się w zakresie 1-5% O_2 (Okazaki i Maltepe, 2006). Wczesna embriogeneza (w tym rozwój układu nerwowego) przebiega w niskim, około 3%, (niektórzy badacze sugerują nawet mniejsze wartości) stężeniu tlenu, co jest związane z faktem, że układ krwionośny na tym etapie nie jest jeszcze rozwinięty. Niskie stężenie tlenu stymuluje ekspresję czynników indukowanych hipoksją, które z kolei aktywują ekspresję genów niezbędnych do powstania krwi, naczyń krwionośnych, rozwoju łożyska, układu nerwowego i innych organów (Simon i Keith 2008). Wpływ stężenia tlenu na embriogenezę ssaków został po raz pierwszy zbadany przez Morrissa i New'a, którzy oceniali przebieg procesu neurulacji w zarodkach szczurzych wystawionych na działanie różnych stężeń tlenu (5%, 10%, 20% i 40%). Wykazali oni, że ekspozycja na 5% i 10% O_2 jest związana z właściwym rozwojem układu nerwowego, natomiast 20% i 40% stężenie tlenu przyczyniało się do upośledzenia morfogenezy i często skutkowało brakiem zamknięcia cewy nerwowej. Przyczyn tych zmian dopatrywali się w zwiększonej śmiertelności i nieprawidłowej migracji komórek neuralnych tworzących cewę (Morriss i New, 1979).

Wykazano, że podczas rozwoju, po utworzeniu układu krwionośnego i rozpoczęciu wymiany gazowej pomiędzy płodem a matką, w zarodku myszy znajdują się specyficzne rejony, w których komórki wystawione są na działanie bardzo niskich stężeń tlenu ($< 2\%$). Takie miejsca znajdują się m.in. w obszarze poduszczyk wsierdciowych rozwijającego się serca, jelitach, płucach, śródmózgowiu, przysadce mózgowej, rdzeniu kręgowym, mostku czy języku. Ustalono, że komórki w tych obszarach wykazują wyższą ekspresję białka HIF1 α . Co sugeruje, że czynnik

transkrypcyjny HIF1 α , jak również hipoksja, są istotne dla właściwego rozwoju tych organów (Dunwoodie 2009). Można na tej podstawie wnioskować, że są to swoiste nisze tych komórek podczas rozwoju zarodkowego, a hipoksja występująca w tych obszarach, jest niezbędna do zachowania ich właściwości.

Podobnie jak cały organizm w czasie rozwoju, komórki macierzyste dorosłego organizmu rezydując w swoich niszach są poddane działaniu niskich stężeń tlenu. Przypuszcza się, że daje im to pewną przewagę i jest korzystne dla pełnionych przez nie funkcji (Cipolleschi i wsp. 1993). Komórki, które prowadzą metabolizm tlenowy są bardziej narażone na stres oksydacyjny, gdyż tworzą wolne rodniki, które mogą powodować uszkodzenia ich DNA. W warunkach obniżonego stężenia tlenu, komórki znajdujące się w niszy, uzyskujące energię w wyniku metabolizmu beztlenowego są w mniejszym stopniu narażone na mutacje. Badania prowadzone na mysich zarodkowych fibroblastach (ang. *Mouse Embryonic Fibroblasts*, MEF) potwierdziły, że hodowla w 20% w porównaniu z 3% O₂ sprzyjała kumulacji mutacji i większej śmiertelności komórek (Busutti i wsp. 2003).

W badaniach przedklinicznych udowodniono, że mysie neuralne komórki progenitorowe, które były wcześniej inkubowane w warunkach hipoksyjnych, wykazywały zdecydowanie dłuższy okres przeżycia po przeszczepie do mózgu po udarze niedokrwiennym, niż analogiczna populacja komórek, która nie była poddana prekondycjonowaniu. Ponadto komórki te wykazywały zwiększone różnicowanie w kierunku neuronalnym oraz przyspieszoną i wyraźniejszą poprawę funkcji czuciowych i motorycznych (Theus i wsp. 2008). Te i inne badania skłaniają do wprowadzania nowej strategii prowadzącej do zwiększenia kompetencji terapeutycznej KM w leczeniu schorzeń neurologicznych, jaką jest ich hodowla w warunkach obniżonego poziomu tlenu (Lech i wsp. 2017, Sandvig i wsp. 2017)

1.5.2.1. Czynniki Indukowane Hipoksją (HIF)

Jedną z komórkowych adaptacji do niskiego poziomu tlenu jest ekspresja czynników indukowanych hipoksją. Czynniki HIF są pierwszymi związkami syntezowanymi przez komórki w odpowiedzi na niskie stężenie tlenu. Ich obecność pociąga za sobą indukcję transkrypcji wielu związków biorących udział m.in. w angiogenezie, metabolizmie żelaza, glukozy czy szlakach związanych z proliferacją komórek (Semenza, 2004, Ke i wsp. 2006). Zostały one odkryte w 1991 roku przez

Semenzę podczas badań nad wpływem hipoksji na ekspresję erytropoetyny (EPO) (Semenza i wsp. 1991).

Czynnik HIF jest heterodimerem zbudowanym z podjednostek alpha (α) o masie 120 kDa i beta (β) o masie 91, 93 lub 94 kDa. Znane są trzy rodzaje podjednostek alpha (1α , 2α /EPAS1 i 3α), a ich ekspresja jest zależna od stężenia tlenu. Podjednostka beta, nazywana również ARNT (ang. *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*) ulega ekspresji konstytutywnej niezależnej od stężenia tlenu. Stwierdzono, że czynniki HIF należą do podrodziny czynników transkrypcyjnych PAS (zawierających domenę Per-ARNT-Sim), która jest częścią większej rodziny basic helix-loop-helix (bHLH). Białka zawierające w swojej budowie domenę PAS są najczęściej białkami sygnałowymi o właściwościach sensorów, biorącymi udział w odpowiedzi komórek na zmieniające się warunki środowiska (Wang i wsp. 1995, Semenza, 2004).

Podjednostki alpha i beta posiadają podobną budowę, w skład której wchodzi: koniec N-terminalny zawierający domenę bHLH; część centralna z domeną PAS, która ułatwia heterodimeryzację oraz koniec C, do którego wiązane są białka biorące udział w regulacji transkrypcji (Semenza, 2004). W odpowiednich warunkach tlenowych stabilna podjednostka alpha przenoszona jest do jądra komórkowego, gdzie dimeryzuje z podjednostką beta. HIF działa wiążąc się do miejsca HRE (ang. *HIF-responsive elements*) obecnego w promotorach niektórych genów. Miejsce to zawiera sekwencję NCGTG, gdzie N może być zarówno adenozyną (A) jak i guaniną (G) (Wilkins i wsp. 2016). Stabilność i aktywność podjednostki alpha jest regulowana przez różne modyfikacje post-translacyjne (ang. *Post-Translational Modifications*, PTM), np.: hydroksylację, ubikwitynację, acetylację czy fosforylację. W warunkach atmosferycznego stężenia tlenu hydroksylacja konserwatywnej reszty prolinowej (Pro 402 i/lub Pro 564) podjednostki alpha przez hydroksylazę prolinową HIF powoduje jej rozpoznanie i ubikwitynację przez ligazę ubikwitynową E3. Tak oznakowana podjednostka alpha kierowana jest do degradacji w proteasomach. W warunkach obniżonego stężenia tlenu (hipoksji) dochodzi do zablokowania działania hydroksylazy prolinowej HIF i zwiększenia stężenia czynnika HIF w komórkach. Stabilne białko HIF zwiększa ekspresję genów, które ułatwiają przeżycie komórek w warunkach obniżonego stężenia tlenu, m.in. erytropoetyny (EPO) i czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) promując tym samym angiogenezę, czy też enzymów glikolitycznych, pozwalając na beztlenową syntezę ATP.

Próbuje się stworzyć terapie polegające na zamierzonej zmianie ekspresji samych białek HIF lub ich genów docelowych. Do tej pory skupiały się one głównie na: i) zwiększeniu ekspresji genów docelowych dla HIF np. EPO w leczeniu anemii, ii) zablokowaniu aktywności transkrypcyjnej HIF w terapiach przeciwnowotworowych. Ponadto prowadzone są próby zastosowania czynników HIF w leczeniu trudno gojących się ran, niedotlenieniach kończyn czy w udarach (Masoud i Li 2015, Wilkins i wsp. 2016).

Prowadzone są badania podstawowe dotyczące kontroli ekspresji genów zależnych od czynników indukowanych hipoksją, w których stosuje się związki wpływające na ekspresję i akumulację czynników HIF w komórce, m.in. inhibitory: DMOG, Roxadustat (FG-4592), IOX2, 2-Methoxyestradiol (2-MeOE2) (Deppe i wsp. 2016, Yu i wsp. 2016, Liu i wsp. 2015, Milosevic i wsp. 2009).

DMOG jest specyficznym, łatwo przechodzącym przez błonę komórkową inhibitorem 4-prolyl hydroksylazy (ang. *prolyl-4-hydroxylase inhibitor*), który zwiększa poziom białka HIF1 α w komórce, dzięki zablokowaniu jego degradacji przez PAH (ang. *Prolyl and Asparaginyl Hydroxylase*). DMOG stabilizuje ekspresję HIF1 α w warunkach tlenu atmosferycznego, sprzyja angiogenezie i ma właściwości neuroprotektoryjne.

1.5.2.2. Wpływ hipoksji i czynników HIF na różnicowanie i proliferację NSC

W niszach komórek macierzystych, gdzie stężenie tlenu jest relatywnie niskie, komórki są w mniejszym stopniu narażone na uszkodzenia oksydacyjne. Jest to jeden z mechanizmów zapobiegających mutacjom, w komórkach, których jedną z najważniejszych cech jest zdolność do podziałów i samoodnowy. Ponadto wiadomo, że obniżone stężenie tlenu może powodować aktywację szlaków sygnałowych związanych z czynnikami OCT4 i NANOG - niezbędnych dla utrzymania macierzystości (Simon i Keith, 2008).

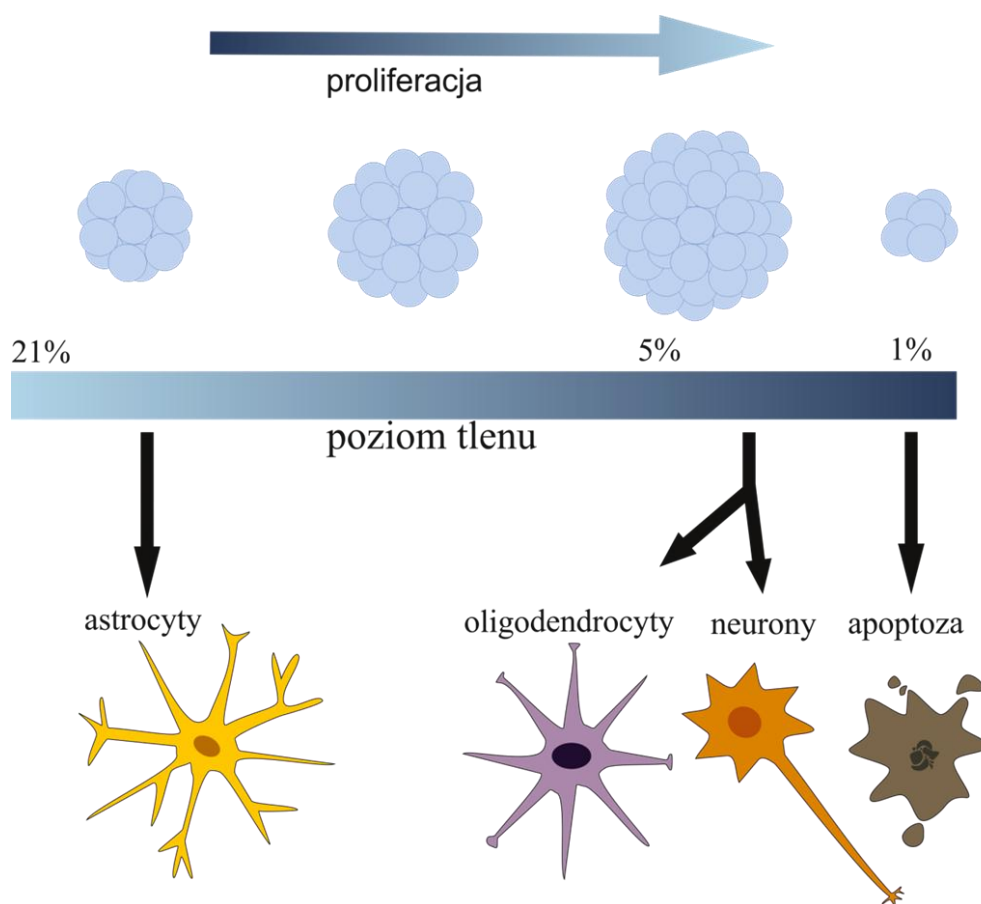
Do niedawna, podobnie jak wszystkie inne linie komórkowe, komórki macierzyste były hodowane w warunkach tlenowych zbliżonych do atmosferycznych (20-21%), co utrudniało właściwe określenie interakcji pomiędzy czynnikami regulującymi ich procesy rozwojowe (Scadden, 2006). Jednakże od jakiegoś czasu, w naszym i innych laboratoriach na świecie, prowadzone są badania, które wykazały, że stężenie tlenu w hodowli komórkowej ma duży wpływ zarówno na biologię zarodkowych, jak

i dojrzałych komórek macierzystych (Eliasson i Jonsson 2010; Panchision 2009; Silvan i wsp. 2009, Szablowska-Gadomska i wsp. 2011, Drela i wsp. 2014, Lech i wsp. 2017).

Wykazano, że wpływ hipoksji na różnicowanie i proliferację komórek macierzystych i progenitorowych jest związany z czynnikami HIF, a nadekspresja HIF1 α wpływa na komórki w podobny sposób, jak zastosowanie obniżonego stężenia tlenu w hodowli (Zhu i wsp. 2005, Pistollato i wsp. 2007, Zhao i wsp. 2008, Giese i wsp. 2010, Szablowska-Gadomska i wsp. 2012, Drela i wsp. 2014).

Czynniki indukowane hipoksją zmieniają ekspresję genów, których produkty pełnią ważną rolę w szlakach sygnałowych (m.in. Notch, BMP) regulujących samoodnawianie i różnicowanie NSC (Gustafsson i wsp. 2005; Zhao i wsp. 2014). Obniżone stężenie tlenu w hodowli (2,5-5%) aktywuje szlaki sygnałowe Wnt/ β -katenina i Notch, a także promuje ekspresję *OCT4*, sprzyjając tym samym samoodnawianiu komórek i zwiększając ich proliferację. Zwiększenie stężenia tlenu w hodowli do stężenia atmosferycznego (około 21%) prowadzi do spowolnienia proliferacji komórek, natomiast obniżenie tego poziomu do około 1% często prowadzi do ich apoptozy. Ponadto poziom tlenu w hodowli ma zasadniczy wpływ na kierunek różnicowania NSC (Ryc. 4) (Ezashi i wsp. 2005, Santilli i wsp. 2010, De Filippis i Delia 2011).

Badania prowadzone przez Giese i współpracowników wykazały, że niski poziom tlenu w hodowli (3% O₂) powodował zwiększone różnicowanie w kierunku neuronalnym ludzkich płodowych progenitorów neuralnych oraz, że w ten proces jest zaangażowana erytropoetyna (Giese i wsp. 2010). Natomiast z badań przeprowadzonych przez Pistollato i współpracowników, którzy testowali ludzkie progenitory neuralne, wynika, że 5% O₂ zwiększał (około 17 razy) liczbę uzyskanych w wyniku różnicowania oligodendrocytów, podczas gdy 20% O₂ promował różnicowanie astrocytarne. Co ciekawe, przeniesienie hodowli oligodendrocytów uzyskanych w warunkach 5% O₂ do 21% O₂ promowało przyspieszenie ich dalszego różnicowania (Pistollato i wsp. 2007).



Rycina 4. Zależność pomiędzy stężeniem tlenu w hodowli NSC, a ich preferencją do różnicowania w określonym kierunku i proliferacją (na podstawie De Filippis i Delia 2011, zmodyfikowane).

Jednoznaczna ocena, w jaki sposób obniżenie stężenie tlenu wpływa na los komórek jest utrudniona, gdyż do tej pory nie zostały stworzone jednolite procedury i nomenklatura dotycząca tego, czym jest hipoksja, normoksja czy hiperoksja w odniesieniu do hodowli komórkowej. Istnieje wiele badań z zastosowaniem zmiennych warunków tlenowych, gdzie autorzy stosują określenie hipoksja w stosunku do zastosowanych przez siebie warunków, jednakże zakres ten waha się od 1 do 10% O_2 , co znacznie utrudnia porównywanie i właściwą interpretację uzyskiwanych przez nich wyników. Dla ujednoczenia nomenklatury wprowadzono termin „fizjologicznej normoksji”, który odnosi się do warunków tlenowych występujących endogennie w niszach komórek macierzystych (Ivanovicz 2009).

Przytoczone badania jednoznacznie świadczą o tym, że niższe niż atmosferyczne stężenie tlenu sprzyja proliferacji i utrzymaniu macierzystości komórek macierzystych i progenitorowych, dlatego też zasadne wydaje się stosowanie w badaniach teoretycznych i aplikacyjnych niskiego, występującego w mózgu, stężenia tlenu.

1.5.3. Zmiany epigenetyczne w różnicowaniu NSC

W genomie zapisana jest kompletna instrukcja pozwalająca na wzrost i rozwój każdego organizmu. Informacje zapisane przez geny, kodujące konkretne białka niezbędne do funkcjonowania poszczególnych typów komórek, obecne są w każdej z nich, ale nie wszystkie są dla nich „dostępne” w tym samym czasie. Podczas rozwoju organizmu specyficzne geny są aktywowane i ulegają ekspresji w ściśle określonym czasie i kontekście rozwojowym. Jest to możliwe dzięki temu, że istnieją mechanizmy pozwalające na ich „włączanie” i „wyłączenie”. Zmiany w ekspresji genów wynikają m.in. ze zmian dotyczących samego łańcucha DNA (metylacji DNA) i/lub z modyfikacji histonów - białek, które stanowią podstawowe rusztowanie utrzymujące nukleosomową budowę łańcucha deoksyrybonukleotydowego. Zmiany te są efektem poreplikacyjnej modyfikacji DNA lub potranslacyjnej modyfikacji histonów (ang. *Post-Translational Modifications*, PTMs).

Termin "epigenetyka" został wprowadzony w 1942 roku przez Konrada Waddingtona do opisanie interakcji pomiędzy genotypem, a wpływającym na niego środowiskiem, które razem kształtują fenotyp (Waddington 1942). Obecnie istnieje kilka definicji epigenetyki. Epi - (z greckiego: *επί*- ponad, zewnętrzny) - genetyka odnosi się do mechanizmów pozagenowej regulacji ekspresji genów. W odróżnieniu od klasycznej genetyki, epigenetyka nie jest związana ze zmianami w samej sekwencji DNA.

Mechanizmy epigenetyczne, które kontrolują ekspresję genów możemy podzielić na trzy grupy: (i) metylację DNA, (ii) modyfikacje histonów i chromatyny, w tym różne warianty białek histonowych oraz (iii) niekodujące RNA (ang. *non-coding RNA*, ncRNA), włączając mikro RNA (ang. *microRNA*, miRNA) i małe interferujące RNA (ang. *small interfering RNA*, siRNA) (Mohamed Ariff i wsp. 2012).

1.5.3.1. Modyfikacje epigenetyczne i enzymy za nie odpowiedzialne

Metylacja DNA

Metylacja DNA jest jedną z najlepiej poznanych i opisanych modyfikacji epigenetycznych. Jest zaangażowana w wiele procesów komórkowych, m.in. w regulację ekspresji genów (Keshet i wsp. 1986), inaktywację chromosomu X (Heard

i wsp. 1997), genomowy imprinting (Li i wsp. 1993, Denomme i Mann, 2013), regulację struktury chromatyny (Bernstein i wsp. 2007), wyciszanie transpozonów (Walsh i wsp. 1998) czy kontrolę długości telomerów (Gonzalo i wsp. 2006).

Metylacja polega na przeniesieniu grupy metylowej (-CH₃) na cytozynę i jest katalizowana przez metylotransferazy DNA (ang. *DNA methyltransferase*, DNMT). W wyniku tego dochodzi do powstania 5-metylcytosyny (5mC) (Cheng i wsp. 1993). Istnieje również alternatywna forma metylacji DNA - 5-hydroksymetylcytosyna (5hmC), zaangażowana w proces aktywnej demetylacji (Kriaucionis i Heintz, 2009, Tahiliani i wsp. 2009). Wzór metylacji DNA jest tworzony *de novo* już podczas rozwoju zarodkowego dzięki dwóm metylotransferazom: DNMT3A i DNMT3B wspomaganym przez DNMT3L. Za utrzymanie wzoru metylacji przez cały okres życia organizmu odpowiada metylotransferaza DNMT1 (Li i Zhao, 2008).

Uważa się, że metylacja DNA wpływa na ekspresję genów na dwa sposoby. Po pierwsze, zmetylowanie DNA fizycznie zapobiega wiązaniu się niektórych czynników transkrypcyjnych, co skutkuje zablokowaniem transkrypcji. Po drugie, metylowane dinukleotydy CpG są rozpoznawane przez białka należące do rodziny MBD (ang. *methyl-CpG-binding domain*), które aktywnie blokują miejsca swojego wiązania, prowadząc do inaktywacji genów (Li i Zhao, 2008). Białka te mogą również hamować transkrypcję przy współpracy z enzymami odpowiedzialnymi za modyfikacje histonów (Nan i wsp. 1998).

Kiedyś uważano, że metylacja DNA jest modyfikacją stałą, nieusuwalną. Jednakże prowadzone ostatnio badania udowodniły, że istnieją dwa sposoby demetylacji DNA: aktywna i pasywna. Bierna związana jest z zablokowaniem działania DNMT1, natomiast aktywna zachodzi na drodze enzymatycznej i jest katalizowana przez TET1 (ang. *tet methylcytosine dioxygenase 1*) (Wu i Zhang, 2010, Guo i wsp. 2011) lub GADD45A (ang. *Growth Arrest and DNA-Damage-inducible protein*) (Teperek-Tkacz i wsp. 2011).

Metylacja to proces symetryczny, zachodzący na obydwu niciach DNA, głównie w obrębie tzw. wysp CpG - miejsc bogatych w występujące po sobie cytozynę (C) i guaninę (G), zlokalizowanych w końcu 5' promotorów genów niezbędnych dla funkcjonowania komórki (ang. *housekeeping genes*) oraz genów specyficznych tkankowo. Metylacja promotorów genów w wyspach CpG skutkuje brakiem aktywności transkrypcyjnej tych genów (Lister i wsp. 2009). Uważa się, że metylacja regionów poza CpG może mieć kluczowe znaczenie w utrzymaniu stanu pluripotencji przez

komórki (Lister i wsp. 2009). Dodatkowo metylacja proksymalnych fragmentów promotorów genów typowych dla różnicowania wycisza je, powstrzymując komórki przed różnicowaniem. Odkryto, że metylacja występująca poza obszarami promotorowymi jest również zaangażowana w regulację transkrypcji, co ciekawe ułatwia ją poprzez utrzymanie chromatyny w stanie aktywnym. Wykazano, że geny, które ulegają transkrypcji mają wysoki poziom metylacji w obrębie kodującym (Lister i wsp. 2009, Wu i wsp. 2010).

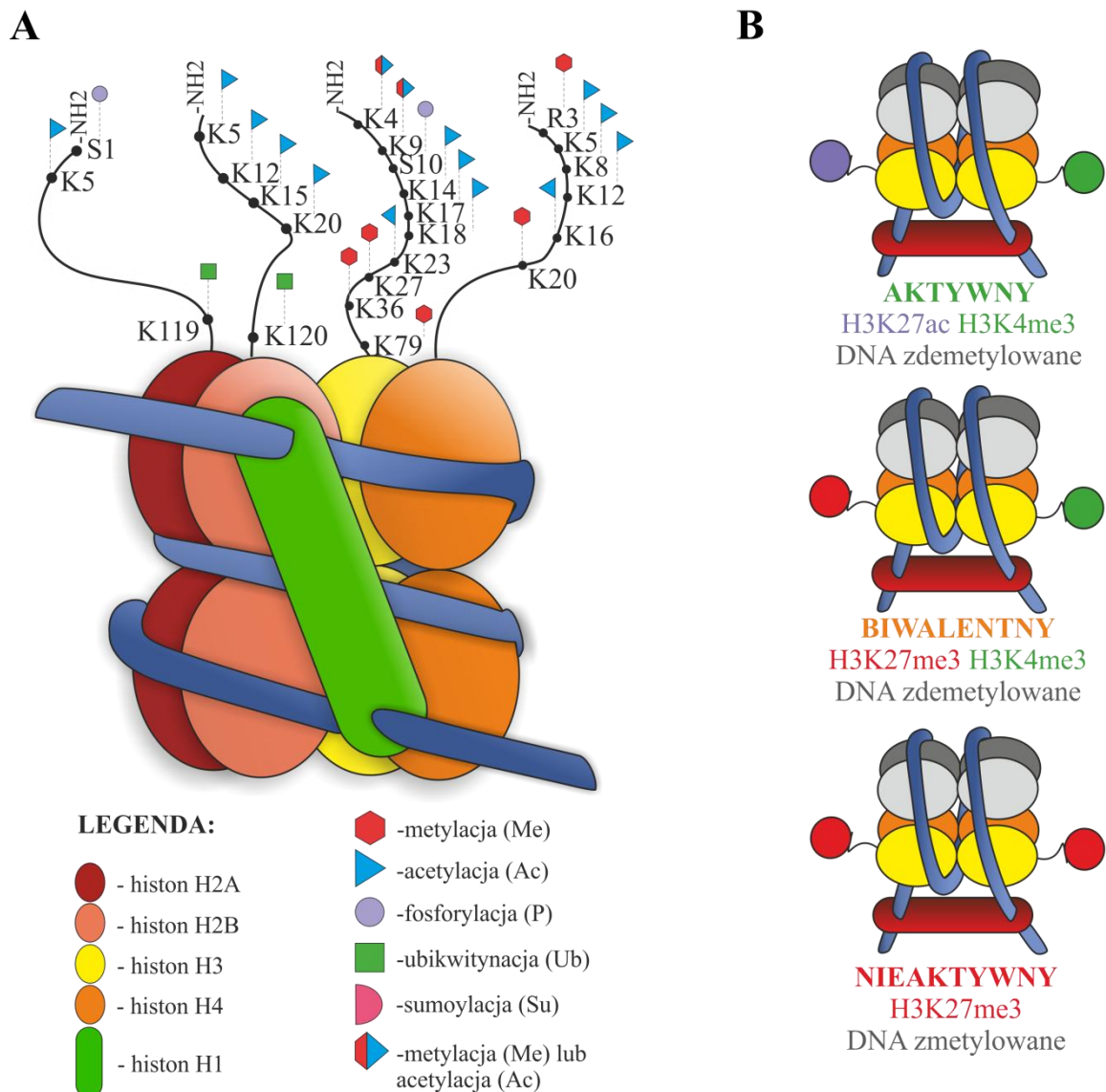
Modyfikacje post-translacyjne histonów

Nukleosomy są podstawową jednostką strukturalną chromatyny, zbudowaną z DNA i histonów. Łańcuch DNA o długości 146 par zasad (pz) jest owinięty wokół oktamerowego rdzenia zbudowanego z tetrameru histonów H3 i H4 (H3–H4)₂ i dwóch dimerów H2A–H2B. Pojedyncze nukleosomy są połączone fragmentem DNA o długości 10-50 pz (tzw. DNA łącznikowy) i spięte histonem łącznikowym (H1) (Luger i wsp. 1997). Struktura nukleosomu przedstawiona jest na rycinie 5A.

Histony są małymi zasadowymi białkami zbudowanymi z globularnego rdzenia, końca C i pozytywnie naładowanego końca N, który jest dostępny poza nukleosomem (tzw. ogon – ang. *histone tail*) i jest miejscem wielu modyfikacji post-translacyjnych (Jenuwein i Allis, 2001). Końce histonów dzięki swojej zasadowości (duża zawartość lizyny i argininy) odgrywają ważną rolę w utrzymaniu struktury nukleosomu. Dodatkowo naładowane N-końce histonów oddziałują z ujemnie naładowaną helisą DNA, umożliwiając utrzymanie odpowiedniej struktury i upakowania chromatyny. Są one również miejscem licznych modyfikacji post-translacyjnych, m.in.: acetylacji, metylacji, fosforylacji, ADP-rybozylacji, ubikwitynacji, SUMOilacji, biotynylacji. Zarówno budowa chromatyny, jak i modyfikacje post-translacyjne zmieniają dostępność chromatyny dla czynników transkrypcyjnych. PTMy mogą również wpływać na replikację czy procesy naprawy DNA (Kouzarides 2007, Rothbart i Strahl, 2014).

Stwierdzono, że różne kombinacje modyfikacji post-translacyjnych wpływają w odmienny sposób na regulację ekspresji genów. Mogą działać synergistycznie lub antagonistycznie. Każda komórka poza swoim kodem genetycznym (identycznym we wszystkich komórkach danego organizmu) posiada również tzw. kod epigenetyczny, który jest tkankowo/komórkowo specyficzny. Teorie tę opisuje „hipoteza kodu

histonowego” (ang. “*Histone Code Hypothesis*”) zaproponowana w 2001 przez Tomasa Jenuwein’a i Davida Allis’a (Jenuwein i Allis 2001, Turner 2007).



Rycina 5. Budowa nukleosomu z zaznaczonymi modyfikacjami post-translacyjnymi (A) oraz zależność aktywności transkrypcyjnej genów od metylacji (me), acetylacji (ac) i metylacji DNA (B) (na podstawie Podobińska i wsp. 2017).

Acetylacja histonów

Acetylacja histonów zachodzi na N-końcach histonów H3 i H4. Polega na przeniesieniu reszty acetylowej (CH₃-C(O)-) na lizynę (K). Najczęściej modyfikowane są: K9, K14, K18 i K23 w histonie 3 i K5, K8, K12 i K16 w histonie 4. Acetylacja

zmienia ładunek na grupie aminowej i powoduje zmniejszenie oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy dodatnio naładowanym histonem i ujemną nicią DNA. Uniemożliwia tym samym powstawanie struktur chromatynowych wyższego rzędu, powodując jej rozluźnienie i ułatwiając wiązanie, i działanie czynników transkrypcyjnych. Ponadto zmniejsza asocjację histonu łącznikowego, promując rozluźnienie chromatyny (Lilja i wsp. 2012). Wykazano, że aktywna transkrypcyjnie euchromatyna i nieaktywna heterochromatyna wykazują różne wzorce acetylacji. W euchromatynie obserwuje się reszty acetylowe na lizynach w pozycji 5, 8 12 i 16 na histonie H4, podczas gdy w heterochromatynie miejsca te nie są zacetylowane (O'Neill i Turner 1995).

Acetylacja jest procesem dynamicznym i zależy od dwóch grup enzymów: acetylotransferaz histonów (ang. *histone acetyltransferases*, HAT), które są zdolne przenosić grupy acetylowe na wybrane lizyny i często pełnią funkcje koaktywatorów transkrypcji oraz deacetylaz histonów (ang. *histone deacetylases*, HDAC), które usuwają te modyfikacje i są korepresorami transkrypcji. Obecnie u ssaków poznanych jest 18 HDAC, które zostały podzielone na cztery klasy. Wykazano, że każda z klas ma inny profil ekspresji. Reprezentantów klasy I (HDAC1, 2, 3, 8) spotyka się głównie w jądrach komórkowych, podczas gdy przedstawiciele klasy II (HDAC4, 5, 7, 9) występują zarówno w jądrach, jak i cytoplazmie, jednakże ich ekspresja jest bardziej specyficzna tkankowo, co sugeruje ich udział w procesach różnicowania (Haigis i Sinclair, 2010; Lian i wsp. 2012; New i wsp. 2012).

Deacetylazy histonów należące do klasy I i II są często składowymi większych kompleksów białkowych regulujących transkrypcję, cykl komórkowy czy procesy naprawy DNA. Do najważniejszych z nich możemy zaliczyć: kompleks korepresora SIN3/HDAC, NuRD (ang. *Nucleosome Remodeling and Deacetylase complex*), kompleks CoREST (ang. *Co-Repressor for Element-1-Silencing Transcription factor*) i kompleks N-CoR (ang. *Nuclear receptor Co-Repressor*).

Metylacja histonów

Metylacja histonów zachodzi na resztach argininy (R) i lizyny (K). Zwiększa zasadowość i hydrofobowość zakończeń histonów, zmieniając powinowactwo czynników transkrypcyjnych do łańcucha DNA. Metylacja może prowadzić zarówno do zwiększonej, jak i zmniejszonej ekspresji genów, w zależności od tego, których reszt

dotyczy i ile razy są zmetylowane (może być pojedyncza - me1, podwójna - me2 lub potrójna - me3). Z reguły aktywująca jest metylacja w obrębie lizyny 4, 36 i 79 na histonie 3 (H3K4, H3K36, H3K79), a hamująca lizyny 9 i 27 na H3 (H3K9, H3K27) i K20 na H4 (H4K20). Co ciekawe, geny mogą posiadać modyfikacje typowe dla stanu aktywnego (H3K4me3), nieaktywnego (H3K27me3) lub oba, co określamy mianem stanu biwalentnego lub uśpionego (ang. *bivalent, poised state*) (Ryc. 5B). Geny takie są nieaktywne transkrypcyjnie, ale mogą być łatwo aktywowane np. podczas różnicowania (Bernstein i wsp. 2006, Boheler 2009).

Metylacja histonów jest procesem odwracalnym. Przyłączenie reszty metylowej katalizowane jest przez metylotransferazy (ang. *histone methyltransferase*, HMT), a usunięcie przez demetylasy histonów (ang. *histone demethylase*, HDM).

1.5.3.2. Wpływ modyfikacji epigenetycznych na rozwój układu nerwowego i różnicowanie NSC

Metylacja DNA jest procesem niezwykle istotnym dla rozwoju zarodkowego i formowania się układu nerwowego. Jest też niezbędna do właściwego różnicowania NSC, co jest bezpośrednio związane ze zmianami epigenetycznymi w obrębie promotorów niektórych genów (Wu i wsp. 2010, Gapp i wsp. 2014). Wykazano, że myszy pozbawione *Dnmt1* lub *Dnmt3a* i *Dnmt3b* umierają w trakcie ciąży (Li i wsp. 1992, Ueda i wsp. 2006). Podczas rozwoju zarodkowego neuralne komórki progenitorowe różnicują się głównie w neurony, co jest związane z obecnością metylacji DNA w promotorach genów odpowiedzialnych za różnicowanie astrocytarne. Istotnym genem zaangażowanym w gliogenezę jest GFAP, którego aktywacja polega na aktywnej demetylacji miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego STAT3 w obrębie jego promotora (Takizawa i wsp. 2001, Namihira i wsp. 2009). Wykazano, że *Dnmt1*^{-/-} NPC wykazują znaczną hipometylację DNA i przedwczesne różnicowanie w kierunku astrocytarnym (Fan i wsp. 2005). Metylotransferazy DNMT3A i DNMT1 podlegają silnej ekspresji w postmitotycznych neuronach, a zahamowanie ich syntezy skutkuje zmianami w budowie neuronów, ich utratą, zaburzeniami w funkcjonowaniu synaps, problemami z zapamiętywaniem i uczeniem się. Ponadto regulują podziały progenitorów neuralnych i dojrzałych neuronów. Udowodniono również ich rolę w neurogeniezie wieku dorosłego (Feng i wsp. 2010, Noguchi i wsp. 2015). Noguchi i współpracownicy wykazali, że brak DNMT1 nie zaburzał proliferacji i różnicowania

neuralnych komórek progenitorowych, ale skutkowało zmniejszoną liczbą tworzonych dojrzałych neuronów, co było prawdopodobnie związane ze śmiercią komórek podczas różnicowania. Równocześnie brak DNMT1 nie wpływał na przeżywalność już zróżnicowanych neuronów w hipokampie (Noguchi i wsp. 2015).

Deacetylacja histonów prowadzi do kondensacji chromatyny, zapobiegając w ten sposób wiązaniu czynników transkrypcyjnych do sekwencji docelowych w promotorach genów, hamując tym samym ich ekspresję (Hsieh i Gage 2004).

Acetylacja histonów jest istotna zarówno dla zachowania właściwości pluripotencjalnych ESC jak i dla różnicowania neuralnego. Zależy ona głównie od działalności poszczególnych deacetylaz, których wzór ekspresji jest specyficzny na różnych etapach rozwoju układu nerwowego. HDAC1 wykazuje wysoką ekspresję w mysich NSC i komórkach glejowych, natomiast HDAC2 przeważa w progenitorach neuralnych i dojrzałych postmitotycznych neuronach. Równocześnie nie obserwuje się prawie obecności HDAC2 w dojrzałym gleju. Sugeruje to udział poszczególnych deacetylaz w różnicowaniu podtypów komórek neuralnych (MacDonald i Roskams, 2008).

Ponadto nie tylko typ, czy miejsce wystąpienia modyfikacji histonów, ale też moment ich pojawienia może wpływać na procesy życiowe komórki. Qiao i współpracownicy wykazali, że podczas różnicowania ludzkich ESC *in vitro* w kierunku neuralnym zmienia się poziom acetylacji lizyny 9 na histonie 3 (H3K9Ac). W ciągu pierwszych 4 dni różnicowania poziom H3K9Ac maleje, co przekłada się na zmniejszoną acetylację genów związanych ze stanem pluripotencjalności (i ich ograniczoną ekspresją). Następnie, wraz z postępującym różnicowaniem neuralnym obserwowany jest wzrost poziomu H3K9Ac. Co ciekawe, zastosowanie inhibitorów HDAC (ang. *HDAC inhibitors*, HDACi) skutkowało zahamowaniem różnicowania komórek (Qiao i wsp. 2015).

Wykazano, że zahamowanie HDAC wpływa na neurogenezę w mysim DG zmniejszając liczbę progenitorów neuralnych i zaburza stosunek ilościowy poszczególnych podtypów tworzonych z nich komórek (Foti i wsp. 2013). Wiadomo również, że zablokowanie HDAC zmienia transkrypcję niektórych genów związanych z różnicowaniem neuronalnym w mysich NSC. Zaobserwowano zwiększoną ekspresję pro-neuralnych czynników Neurog1 i NeuroD1, co było związane z początkiem procesu różnicowania. Ponadto było to skorelowane ze zmniejszoną ich proliferacją, wynikającą z zablokowania wyjścia komórek z fazy G1 cyklu komórkowego (Zhou i wsp. 2011).

Przynajmniej dwa spośród znanych kompleksów zawierających deacetylazy histonowe są zaangażowane w różnicowanie komórek w kierunku neuralnym. Kompleks CoREST reguluje ekspresję genów związanych z różnicowaniem neuronalnymi poprzez utrzymywanie chromatyny w stanie aktywnym. Jest odpowiedzialny za przejście komórek pluripotencjalnych do komórek o charakterze progenitorowymi i różnicowanie progenitorów do dojrzałych neuronów. Ponadto wykazano, że jest zaangażowany w regulację genów związanych z plastycznością dojrzałych neuronów (Ballas i wsp. 2005). Natomiast N-CoR jest zaangażowany w rozwój mysiego kresomózgowia i w utrzymywane macierzystości przez NSC. N-CoR wpływa na dwa szlaki związane z rozwojem kresomózgowia: zależnym od receptora kwasu retinowego (ang. *Retinoic Acid Receptor*, RAR) i Notch (Jepsen i wsp. 2007).

Wczesny rozwój organizmu jest ściśle związany z wieloma zmianami w modyfikacjach chromatyny. Udowodniono na przykład, że katalizowana przez G9A dwumetylacja w obrębie H3K9 (H3K9me₂) jest niezbędna do właściwego rozwoju zarodkowego (Zylicz i wsp. 2015). Wykazano, że dwumetylacja w H3K9 występująca w obrębie sekwencji kodujących genów może zaburzać elongację transkrypcji, splicing czy też aktywność elementów regulatorowych (Allo i wsp. 2009).

Zaobserwowano również, że podczas różnicowania progenitorów neuralnych do astrocytów metylacja lizyny 9 w histonie 3 (H3K9) w obrębie promotora *GFAP* jest zastępowana przez metylację lizyny 4 (H3K4). Jest to związane z działalnością czynnika wzrostu fibroblastów (ang. *Fibroblast Growth Factor 2*, FGF2), który z jednej strony hamuje metylację H3K9, a z drugiej indukuje metylację w obrębie H3K4. Umożliwia to przyłączenie kompleksu STAT/CBP do miejsca wiązania w promotorze *GFAP* aktywując tym samym jego transkrypcję (Song i Ghosh, 2004).

Modyfikacje histonów i metylacja DNA oddziałują ze sobą regulując ekspresję genów. Wykazano negatywną korelację pomiędzy poziomem metylacji DNA i modyfikacją histonu typową dla aktywnej chromatyny - H3K4me₃ (Laurent i wsp. 2010). Metylacja DNA i metylacja histonów są zaangażowane w zamykanie cewy nerwowej podczas rozwoju zarodkowego (Zhou, 2012).

Wykazano, że kompleks CoREST hamuje dalsze różnicowanie progenitorów neuralnych przez represję genów związanych z różnicowaniem neuronalnym. CoREST przy współpracy z HMT prowadzi do metylacji w obrębie H3K4. Równoczesna deacetylacja histonów i metylacja lizyny 4 w histonie 3 utrzymuje geny różnicowania

neuralnego w stanie uśpionym (poised state), umożliwiając ich późniejszą aktywację. Ponadto w dojrzałych komórkach, które nie są neuronami kompleks, CoREST przy współpracy z LSD1 (H3K4 specyficzna demetylaza histonów) i H3K9 specyficzną HMT prowadzi do stabilnego zablokowania ekspresji genów związanych z różnicowaniem neuronalnym (Ballas i wsp. 2005).

Niewątpliwie modyfikacje epigenetyczne są istotnym czynnikiem regulującym losy neuralnych komórek macierzystych poprzez sterowanie ekspresją genów odpowiedzialnych za utrzymanie zdolności do samoodnowy czy indukowanie różnicowania.

1.5.4. Związki niskocząsteczkowe modyfikujące różnicowanie NSC

Związki niskocząsteczkowe stanowią dobre narzędzie w badaniu mechanizmów kontrolujących decyzje rozwojowe komórek. Do głównych zalet związków niskocząsteczkowych należą: szybka, zazwyczaj odwracalna i zależna od dawki odpowiedź komórkowa, co umożliwia precyzyjną kontrolę badanych procesów, wpływu ich koncentracji i kombinacji (współdziałania). Łatwość pozyskiwania takich związków i modyfikacji ich struktury podczas syntezy chemicznej, przekłada się na możliwość dostosowywania substancji do potrzeb badacza i optymalizacji jej działania. Związki te łatwo się przechowuje i podaje. Ponadto nie wprowadzają trwałych zmian w DNA, równocześnie pozwalając na kontrolę ekspresji genów, co powoduje, że mogą być użyte zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*. Jednakże istnieją też pewne wady ich stosowania. Z reguły takie związki mają więcej niż jedno miejsce działania, co może powodować nieoczekiwane skutki uboczne. Niektóre ze związków mogą również być cytotoksyczne (Zhang i wsp. 2012). Ponadto pewnym utrudnieniem jest fakt, że ze względu na łatwość tworzenia produkowane są w dużej ilości wariantów, które nie są dokładnie przebadane. Z reguły można znaleźć tylko kilka pozycji literaturowych dotyczących danego związku, co utrudnia porównywanie uzyskanych wyników (Efe i Ding 2011).

Niemniej jednak, związki niskocząsteczkowe, jako grupa związków są jednym z najskuteczniejszych narzędzi w badaniach biomedycznych. Są podstawą w mapowaniu szlaków transdukcji sygnału i zaburzeń tych ścieżek w wielu chorobach. Wydają się być one również istotne w opracowywaniu nowych metod terapii opartych na komórkach macierzystych. Obecnie prowadzone są setki badań oceniających wpływ

stymulacji lub hamowania poszczególnych ścieżek sygnałowych na reprogramowanie, różnicowanie, transdyferencjację czy samoodnowę komórek macierzystych. Uważa się, że dają one największą nadzieję na stworzenie szybkich, efektywnych i bezpiecznych metod terapii komórkowej stosowanych w medycynie regeneracyjnej (Efe i Ding 2011). Poniżej przedstawiono związki niskocząsteczkowe zastosowane w pracy, wraz z ich krótkimi opisami.

RG 108

RG 108 - inhibitor metylotransferaz DNA (DNMT3A i DNMT3B), blokuje metylację DNA *de novo*, wspomaga reprogramowanie komórek (Szabłowska-Gadomska i wsp. 2012).

TSA

TSA (ang. *trichostatin A*) - inhibitor deacetylaz histonów klasy I i II. Hamuje usuwanie grup acetylowych z reszt lizynowych rdzenia histonów, przez co zapobiega kondensacji chromatyny i odblokowuje ekspresję genów. Wykazano, że może wpływać na różnicowanie mysich neuralnych komórek macierzystych w neurony i sprzyjać formowaniu neurytów. Jednakże pojawiają się również wyniki wskazujące, że TSA blokuje różnicowanie neuronalne i sprzyja różnicowaniu hNSC w kierunku astrocytów (Majumder i wsp. 2013, Tomioka i wsp. 2014).

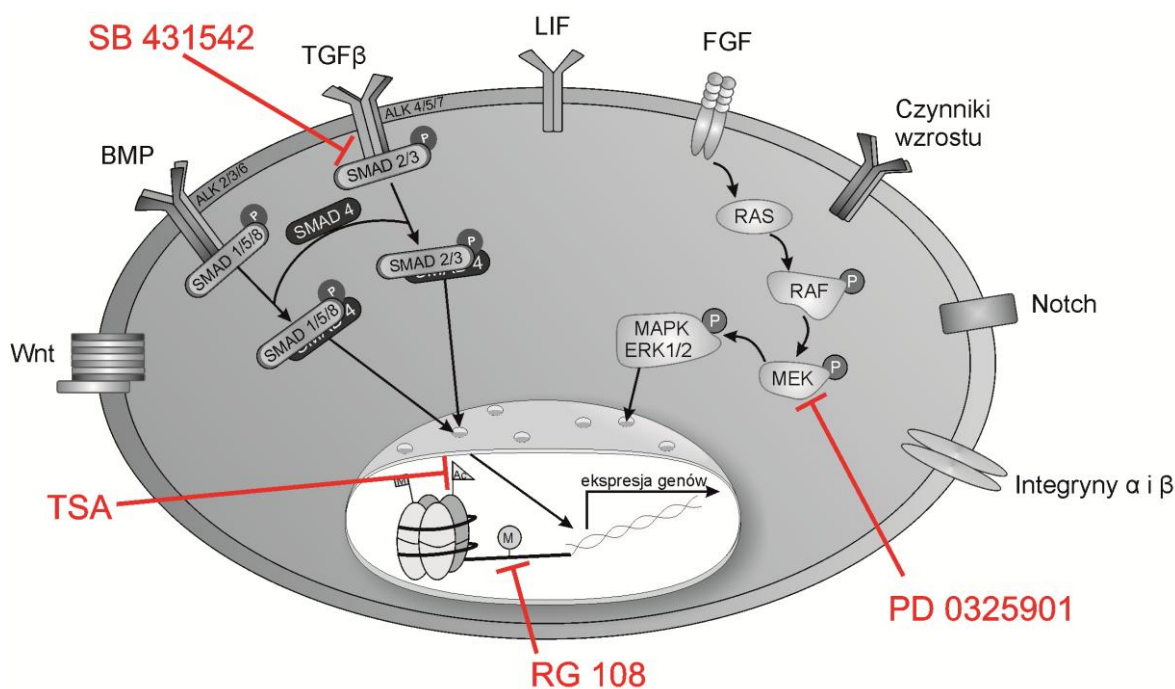
PD 0325901

PD 0325901 – selektywny i bardzo wydajny inhibitor MEK1 (MKK1), hamuje fosforylację kinazy ERK (Bain i wsp. 2007), wpływa na zahamowanie różnicowania komórek ESC i promuje ich samoodnawianie (Tsutsui i wsp. 2011); Został stworzony, jako związek potencjalnie przeciwnowotworowy.

SB 431542

SB 431542 - inhibitor receptorów ALK4, -5 i -7 (receptor typu I dla TGFβ), wykazano, że zwiększa proliferację iPSC, ułatwia reprogramowanie ludzkich komórek, konwersję ludzkich fibroblastów w kierunku neuralnym oraz wspomaga różnicowanie ludzkich ESC do prymitywnych neuralnych komórek macierzystych (pNSC) (Lin i wsp. 2009, Li i wsp. 2011, Ladewig i wsp. 2012).

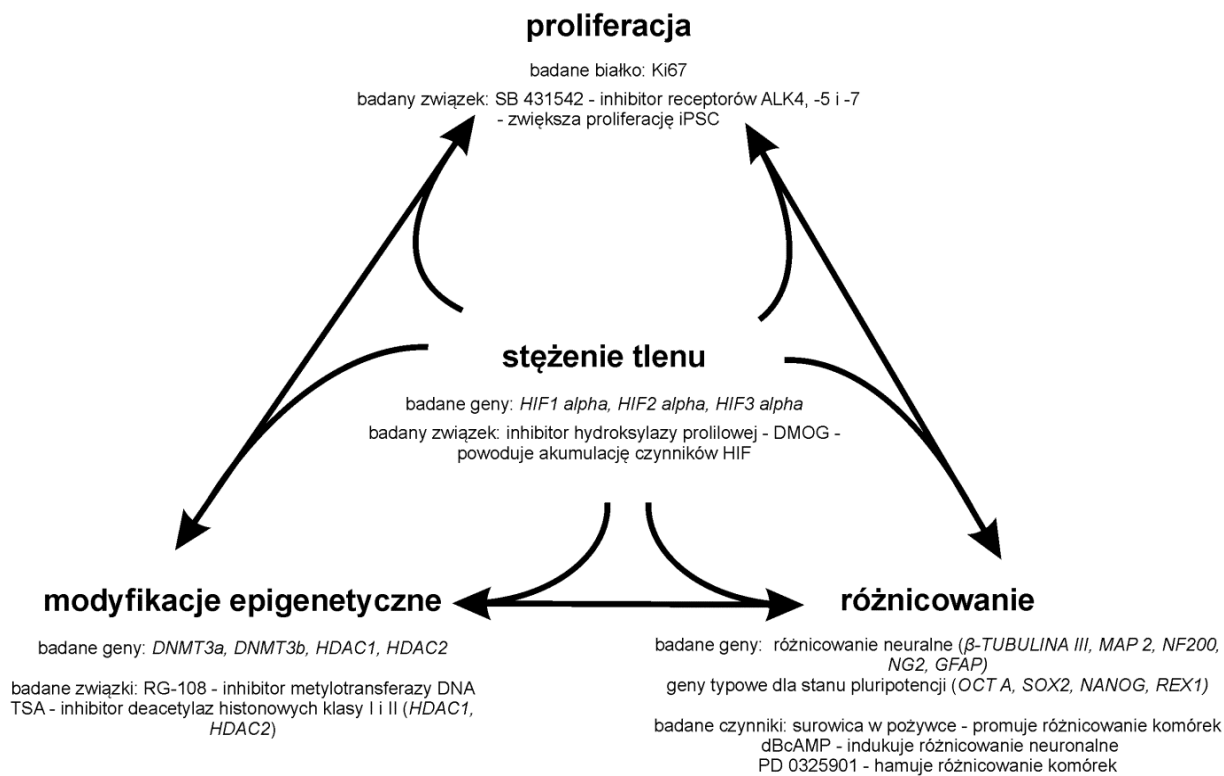
Funkcje, jakie pełnią w komórce zastosowane w pracy związki oraz szlaki sygnałowe, na które oddziałują przedstawiono na rycinie 6.



Rycina 6. Schematyczne przedstawienie szlaków sygnałowych mających wpływ na kierunek rozwoju komórki, z zaznaczonymi związkami stosowanymi w pracy i ich funkcją.

Zastosowanie związków niskocząsteczkowych w tej pracy było narzędziem z wyboru do badania mechanizmów molekularnych towarzyszących procesom proliferacji i różnicowania HUCB-NSC w różnych warunkach mikrośrodowiska *in vitro*.

Niniejsza praca podejmuje próbę wyjaśnienia jaki wpływ na kierunek rozwoju NSC mają poszczególne elementy tworzące niszę, a także jaki jest mechanizm oddziaływań pomiędzy nimi. Na rycinie 7 schematycznie przedstawiono badane zależności pomiędzy stężeniem tlenu, proliferacją, różnicowaniem i działaniem enzymów epigenetycznych w neuralnych komórkach macierzystych z uwzględnieniem genów, których ekspresja była analizowana.



Rycina 7. Schemat obrazujący związek pomiędzy stężeniem tlenu, proliferacją, różnicowaniem i działaniem enzymów epigenetycznych. Zaznaczono badane w tej pracy geny i zastosowane związki z uwzględnieniem ich funkcji znanych z literatury.

2. HIPOTEZA I CEL PRACY

Postawiono dwie hipotezy robocze.

Pierwsza hipoteza zakłada, że obniżony poziom tlenu stymuluje proces proliferacji i różnicowania w komórkach HUCB-NSC w zależności od stadium rozwojowego komórek.

Druga hipoteza zakłada, że mikrośrodowisko *in vitro*, charakteryzujące się obniżonym poziomem tlenu, obecnością adherentnej struktury 3D oraz wybranych związków niskocząsteczkowych, umożliwia utrzymanie hodowli komórek NSC zdolnych jednocześnie do proliferacji, jak i wielokierunkowego różnicowania.

Celem głównym pracy jest określenie warunków biomimetycznych *in vitro* umożliwiających zarówno proliferację, jak i różnicowanie neuralnych komórek macierzystych z krwi pępowinowej HUCB-NSC.

Celami pośrednimi są:

I. Ocena wpływu:

- a) obniżonego poziomu tlenu (5% w stosunku do kontroli 21%),
- b) związków niskocząsteczkowych: TSA, RG 108, PD 0325901, SB 431542,
- c) oraz rodzaju i geometrii rusztowań 3D

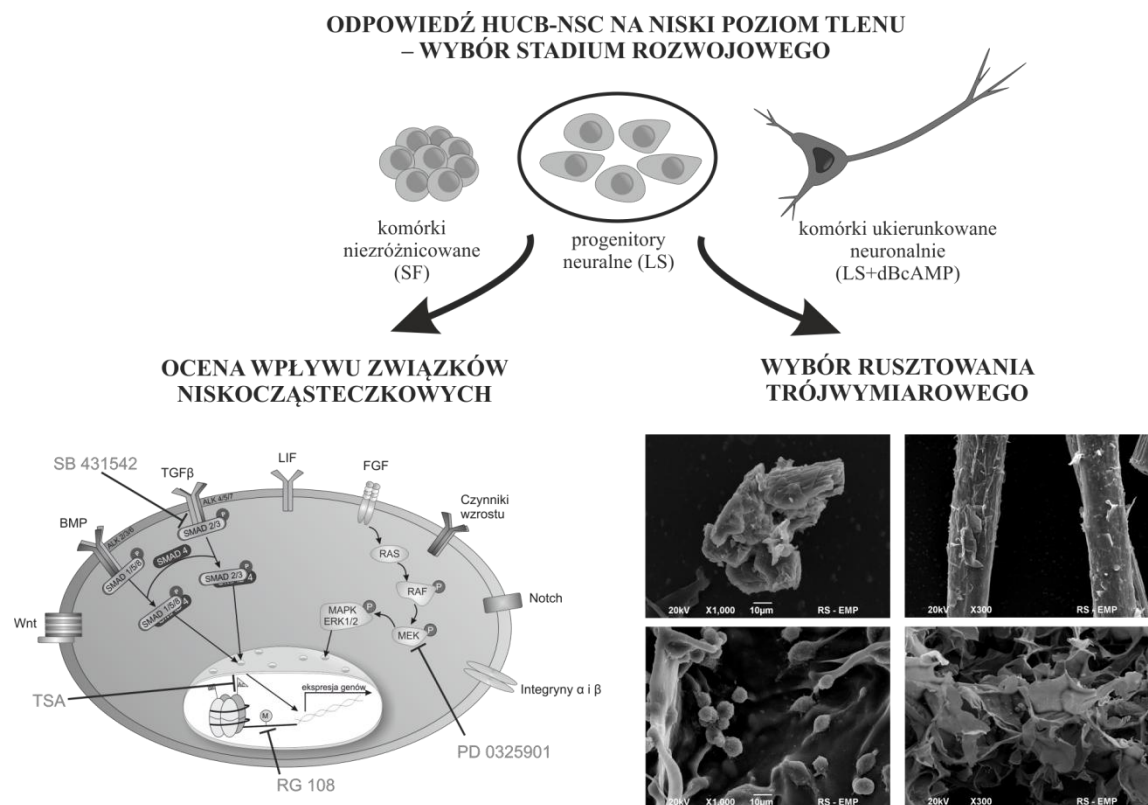
na proces proliferacji i różnicowania HUCB-NSC;

- ### II. Określenie współzależności molekularnych między odpowiedzią komórek HUCB-NSC na obniżony poziom tlenu, ich statusem epigenetycznym i zdolnością do różnicowania (korelacja zmian w profilu ekspresji genów różnicowania neuralnego z genami odpowiedzi na hipoksję i kodującymi enzymy epigenetyczne w warunkach kontrolnych oraz w obecności DMOG - inhibitora hydroksylazy prolinowej).

3. MATERIAŁY I METODY

W pierwszym etapie badań sprawdzono wpływ stężenia tlenu (5% i 21%) na komórki znajdujące się w różnych stadiach rozwoju. Ponadto oceniono, czy akumulacja czynnika HIF1 α będzie miała wpływ na odpowiedź komórek na hipoksję. Analiza wyników uzyskanych w tej części pracy pozwoliła na wybranie do dalszych eksperymentów populacji komórek o najkorzystniejszych cechach (zdolność do proliferacji i wielokierunkowego różnicowania).

Równolegle przeprowadzono doświadczenia oceniające wpływ związków niskocząsteczkowych (TSA, RG 108, PD 0325901, SB 431542) na procesy różnicowania i proliferacji HUCB-NSC, a także możliwości hodowli neuralnych komórek macierzystych na rusztowaniach trójwymiarowych. Przebieg prowadzonych eksperymentów przedstawiono na rycinie 8.



Rycina 8. Schemat przedstawiający ogólny przebieg przeprowadzonych doświadczeń.

3.1. Hodowla komórkowa HUCB-NSC w warunkach 2D

Wszystkie doświadczenia przeprowadzono na nietransformowanej linii neuralnych komórek macierzystych HUCB-NSC, wyprowadzonej z frakcji mononuklearnej CD34 (-) ludzkiej krwi pępowinowej (Bużańska i wsp. 2006). Komórki hodowano w inkubatorach hodowlanych zapewniających odpowiednie warunki: temperaturę 37°C, 95% wilgotność, 5% stężenie CO₂ i 5% lub 21% stężenie O₂.

3.1.1. Ocena wpływu warunków tlenowych na komórki w różnych stadiach rozwoju

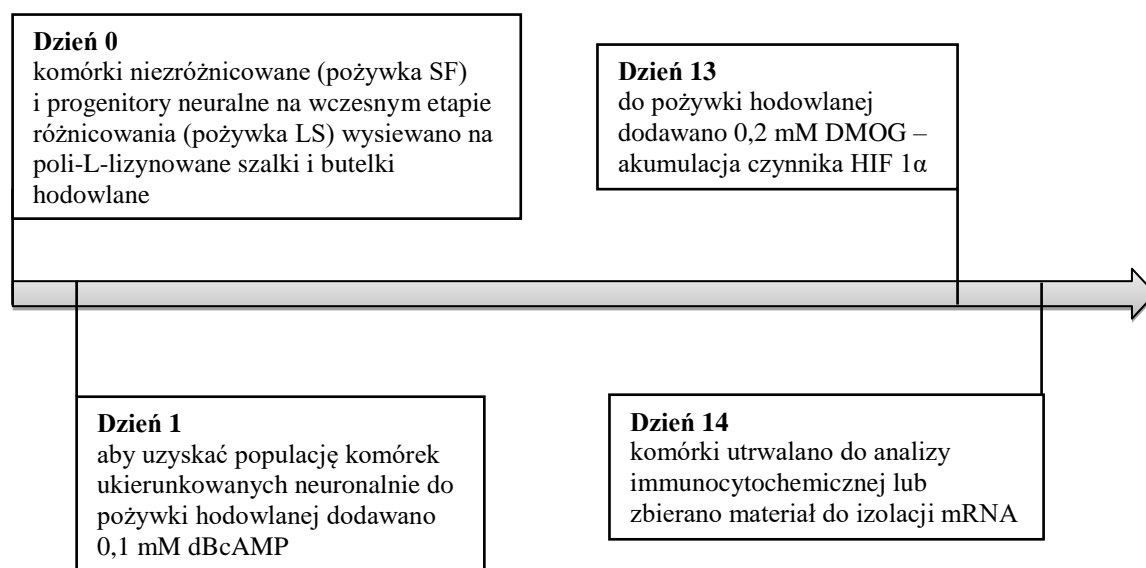
W doświadczeniach obejmujących badania komórek będących na różnych stadiach rozwojowych stosowano dwa typy pożywki hodowlanej: pożywka LS - „Low Serum”- DMEM/F12 (Gibco), 1% ITS (Gibco), 2% FBS (Gibco), 1% AAS (Sigma-Aldrich); pożywka SF - „Serum Free”: DMEM/ F12, 1% AAS, 20 ng/ml EGF (Sigma-Aldrich), 2% B27 (Gibco). Komórki HUCB-NSC hodowane w pożywce nie zawierającej surowicy charakteryzuje brak adhezji do podłoża hodowlanego (komórki unoszą się w postaci agregatów komórkowych), natomiast pożywka z dodatkiem 2% surowicy (FBS) sprzyjała przyleganiu komórek do dna naczyń hodowlanych (Bużańska i wsp. 2006). Pożywkę wymieniano 3 razy w tygodniu, a po osiągnięciu 90-100% konfluencji komórki pasażowano przy użyciu trypsyny.

Zastosowanie różnych pożywek hodowlanych umożliwiło uzyskanie komórek znajdujących się na różnych stadiach rozwoju:

1. komórki niezróżnicowane - hodowla nieprzylegająca, pożywka SF,
2. progenitory neuralne na wczesnym etapie różnicowania – hodowla przylegająca, pożywka LS,
3. komórki ukierunkowane neuronalnie – hodowla przylegająca, pożywka LS + dBcAMP.

Przed rozpoczęciem każdego z eksperymentów komórki hodowano przynajmniej przez 14 dni w warunkach 5% lub 21% stężenia tlenu (prekondycjonowanie – adaptacja komórek do hodowli w określonych warunkach tlenowych), w jednej z 2 pożywek hodowlanych. Następnie wysiewano je w gęstości 5x10³ kom/cm² na poli-L-lizynowane (25µg/ml, Sigma-Aldrich) butelki T25 (BD Falcon) i szalki 24-dołkowe (Dzień 0).

Doświadczenia prowadzono przez 14 dni w różnych warunkach tlenowych (5% i 21%), w pożywce bez surowicy (SF), bądź zawierającej surowicę (LS) w obecności lub bez 0,1 mM dBcAMP (ang. *n6 2'-o-dibutyryl-adenosine 3' 5'-cyclic monophosphate sodium salt*, Sigma-Aldrich). W 13 dniu hodowli do połowy prób dodawano 0,2 mM DMOG (ang. *prolyl-4-hydroxylase inhibitor*, Sigma-Aldrich). Schemat opisywanych doświadczeń przedstawiono na rycinie 9.



Rycina 9. Schemat doświadczenia z zastosowaniem inhibitora DMOG w warunkach 5 i 21% O₂.

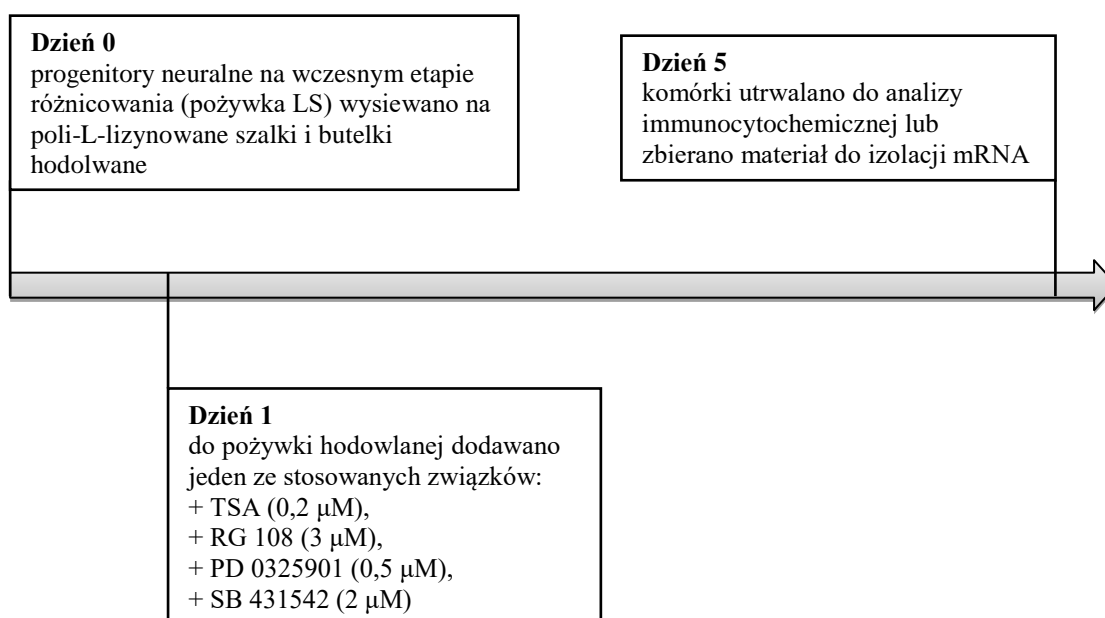
Stosowane w pierwszej części badań warianty doświadczenia wraz ze skrótami stosowanymi do opisu wyników zebrano w Tabeli 1.

Tabela 1. Badane warianty doświadczenia wraz ze skrótami zastosowanymi w dalszym opisie wyników, gdzie C oznacza dBcAMP, D – DMOG.

Warunki tlenowe	Pożywka hodowlana	HUCB-NSC	HUCB-NSC + dBcAMP	HUCB-NSC + DMOG	HUCB-NSC + dBcAMP + DMOG
21% O ₂	LS	LS 21%O ₂	LS 21%O ₂ + C	LS 21%O ₂ + D	LS 21%O ₂ + C + D
	SF	SF 21%O ₂	SF 21%O ₂ + C	SF 21%O ₂ + D	SF 21%O ₂ + C + D
5% O ₂	LS	LS 5%O ₂	LS 5%O ₂ + C	LS 5%O ₂ + D	LS 5%O ₂ + C + D
	SF	SF 5%O ₂	SF 5%O ₂ + C	SF 5%O ₂ + D	SF 5%O ₂ + C + D

3.1.2. Ocena wpływu związków niskocząsteczkowych na komórki w stadium progenitorów neuralnych

Do doświadczeń z zastosowaniem związków niskocząsteczkowych, wybrano komórki w stadium progenitorów neuralnych (pożywka LS), ze względu na ich właściwości - zdolność do proliferacji i potencjał do wielokierunkowego różnicowania. W niniejszej pracy stosowano cztery związki niskocząsteczkowe w następujących stężeniach: 0,2 μM TSA (ang. *trichostatin A*, Sigma-Aldrich), 3 μM RG 108 (Sigma-Aldrich), 0,5 μM PD 0325901 (Cayman Chemical), 2 μM SB 431542 (Cayman Chemical). Komórki hodowano w pożywce (LS) z dodatkiem 2% surowicy i jednego z ww. związków przez 5 dni. Schemat doświadczeń przedstawiono na rycinie 10.



Rycina 10. Schemat doświadczenia z zastosowaniem związków niskocząsteczkowych w warunkach 5 i 21% O_2 .

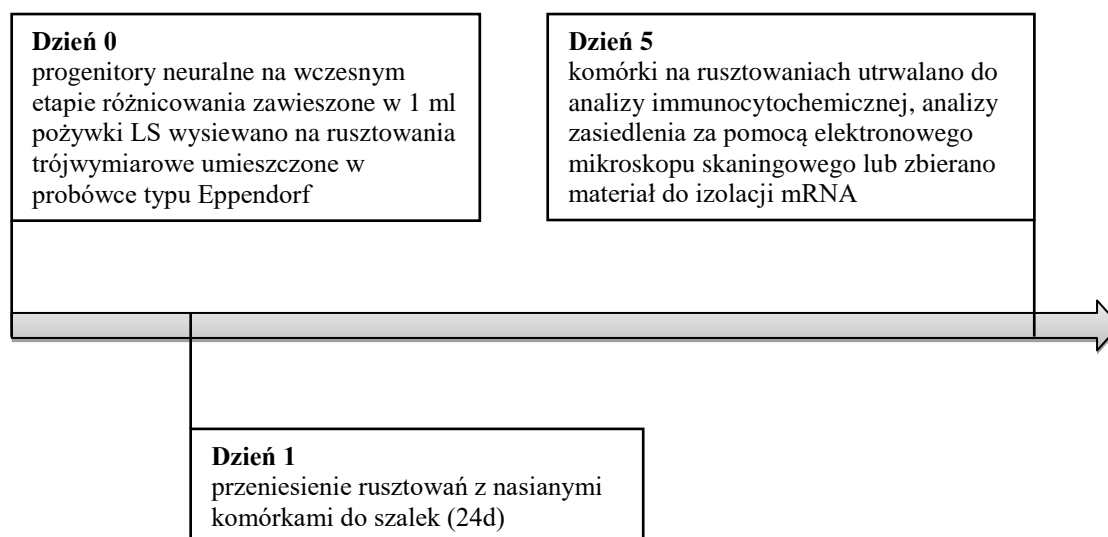
3.2 Hodowla komórkowa HUCB-NSC na rusztowaniach 3D

Do doświadczeń z zastosowaniem rusztowań trójwymiarowych stosowano komórki w stadium progenitorów neuralnych (pożywka LS).

Zbadano cztery rodzaje rusztowań wykonane z trzech typów materiałów:

- Mikromateriał białek współwystępujących z keratyną (ang. *keratin associated protein micromaterial*), w tym: rusztowania o kształcie a) małych prostokątów i b) włókien (Lipkowski i wsp. 2009),
- Chemicznie modyfikowane rusztowania kolagenowe (ang. *chemically modified collagen-based scaffolds*) (Pietrucha, 2015),
- Rusztowania chitozanowe mające zdolność przewodzenia sygnałów elektrycznych (ang. *electroconductive chitosan scaffolds*) (Chhabra i wsp. 2016).

Komórki hodowane w pożywce LS w butelkach hodowlanych o powierzchni 25 cm², po trypsynizacji i zawieszeniu w pożywce LS wysiewano na rusztowania trójwymiarowe w gęstości 1x10⁶ kom/ml. W celu zwiększenia wydajności zasiedlenia rusztowań pierwszy etap przeprowadzano w probówkach typu Eppendorf. Probówki te wykonane są w materiale, który nie sprzyja przyleganiu komórek, co powodowało, że większa liczba komórek wiązała się z rusztowaniami. Proces wysiewania komórek na rusztowania i przebieg doświadczeń z wykorzystaniem rusztowań 3D ilustruje rycina 11.



Rycina 11. Schemat doświadczenia hodowli HUCB-NSC w warunkach 5 i 21% O₂ z zastosowaniem rusztowań trójwymiarowych.

3.3 Badanie ekspresji genów na poziomie mRNA

3.3.1 Izolacja i oczyszczanie mRNA

Całkowite RNA było izolowane metodą Chomczyńskiego (Chomczynski i Sacchi, 1987) z wykorzystaniem odczynnika TRIzol Reagent (Life Technologies). W zależności od typu hodowli, komórki nieprzylegające były przenoszone do probówki wraz z pożywką, w której rosły, natomiast komórki przylegające odklejano od naczyń hodowlanych za pomocą trypsyny. Komórki były wirowane (4 min, 1 000 rpm), supernatant zlewany, a pozostały osad przepłukiwany roztworem PBS. Etap ten był powtarzany dwukrotnie w celu usunięcia ewentualnych zanieczyszczeń pochodzących z pożywki hodowlanej. Następnie po dokładnym usunięciu nadsącza, osad komórkowy zawieszany był w 1 ml TRIzol Reagent i mieszany. Po 5 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, do zawiesiny dodawano 0,3 ml chloroformu (Sigma-Aldrich) i dokładnie wytrząsano do uzyskania jednorodnego roztworu. Po 3 minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, próby wirowano przez 15 minut w temperaturze 4°C przy obrotach 12 000 rpm. Następnie do nowych probówek przenoszono znajdującą się na powierzchni fazę wodną i dodawano 0,5 ml 2-propanolu (Sigma-Aldrich). Próby dokładnie mieszano i inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej. Kolejne wirowanie (10 min, 12 000 rpm, 4°C) pozwalało na uzyskanie osadu RNA, który przemywano 75% roztworem alkoholu etylowego (POCH) i wody wolnej od RNaz (DEPC treated water, Invitrogen). Próby wirowano (5 min, 7 500 rpm, 4°C), nadsącz usuwano, a następnie suszono w temperaturze pokojowej. Uzyskane osady RNA zawieszano w 20 µl wody wolnej od RNaz, wortexowano i inkubowano w temperaturze 37°C przez 10 minut. Materiał mrożono (-20°C) przez 24 godziny, a następnie oceniano ilość i jakość uzyskanego mRNA za pomocą spektrofotometru NanoDrop 1000.

Otrzymane mRNA oczyszczano z genomowego DNA (gDNA) za pomocą DNAzy I zawartej w zestawie DNA-free™ DNA Removal Kit (Invitrogen). Zgodnie z zaleceniem producenta próby rozcieńczano tak, aby uzyskać 50 µl roztworu o maksymalnym stężeniu 200 ng/µl. Następnie dodawano 5 µl buforu (10X DNase I Buffer) i 1 µl enzymu (rDNase I). Próby mieszano i inkubowano w temperaturze 37°C przez 30 minut. Po tym czasie DNazę inaktywowano poprzez inkubację (2 min) z 5 µl DNase Inactivation Reagent. Próby wirowano (2 min, 10 000 rpm), a nadsącz przenoszono do nowych probówek.

Izolację RNA z komórek rosnących na rusztowaniach trójwymiarowych przeprowadzano również metodą Chomczyńskiego, z tą różnicą, że w początkowym etapie izolacji komórki nie były odklejane od rusztowania. Komórki wraz z rusztowaniami były przenoszone do roztworu PBS, w celu odplukania pożywki hodowlanej, a następnie zawieszane w 1 ml TRIzol Reagent, mieszane i inkubowane przez około 30 minut w temperaturze pokojowej. Dalej procedura przeprowadzana była analogicznie do tej stosowanej do izolacji RNA z komórek hodowanych w układach dwuwymiarowych. W przypadku prób zanieczyszczonych wykonywano dwukrotnie oczyszczanie za pomocą roztworu 75% alkoholu etylowego.

3.3.2 Odwrotna transkrypcja

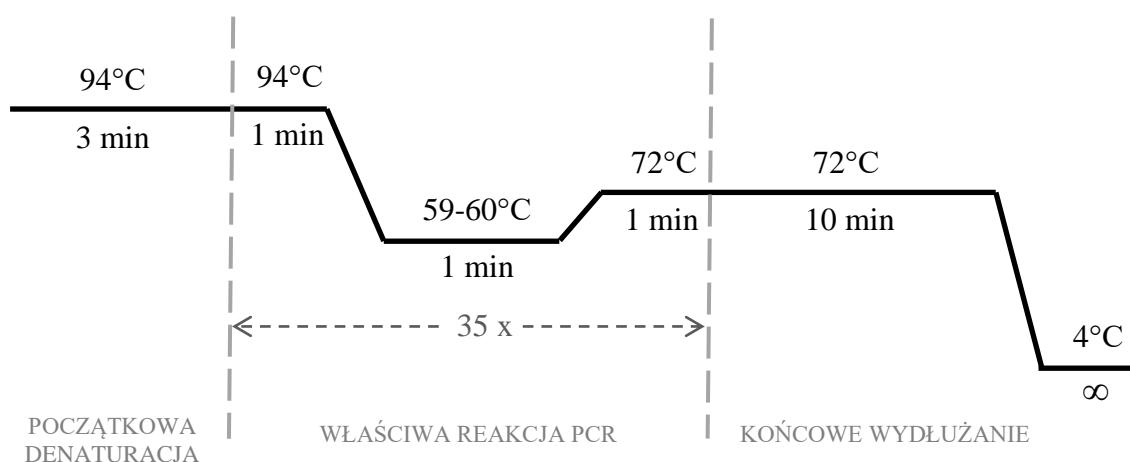
Odwrotną transkrypcję przeprowadzono z użyciem High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems). W skład mieszaniny reakcyjnej ($\Sigma=20 \mu\text{l}$) wchodziły: 10 μl buforu reakcyjnego (2x RT Buffer), 1 μl enzymu (20xRT Enzyme MIX), 5 μl badanego RNA po DNazowaniu i 5 μl wody wolnej od nukleaz. Po dodaniu wszystkich odczynników i dokładnym wymieszaniu, próby inkubowano przez 60 minut w temperaturze 37°C, a następnie zatrzymywano reakcję poprzez podniesienie temperatury do 95°C (5 minut). Tak uzyskane cDNA, podobnie jak RNA, przechowywano w -20°C lub -80°C.

3.3.3. Reakcja PCR i PCR w czasie rzeczywistym

Łańcuchową Reakcję Polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) przeprowadzano stosując zestaw Taq PCR Core Kit (Qiagen), zawierający polimerazę DNA OptiTaq oraz odpowiednio dobrane pary starterów. Skład mieszaniny reakcyjnej ($\Sigma=20 \mu\text{l}$) przedstawiono w tabeli 2. Profil termiczny stosowany podczas łańcuchowej reakcji polimerazy przedstawiono na rycinie 12.

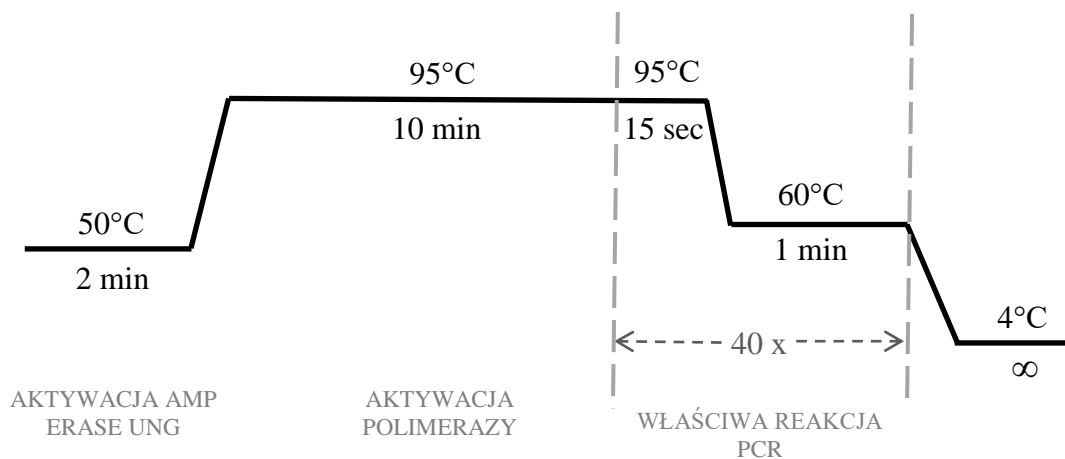
Tabela 2. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej do przeprowadzenia reakcji PCR.

Nazwa odczynnika	Objętość
Reaction mix 10x PCR Buffer	3 μ l
dNTP mix (200 μ M każdy)	0,5 μ l
Taq DNA Polymerase -	0,5 μ l
Starter F	0,4 μ l
Starter R	0,4 μ l
Woda wolna od RNaz	5,2 - X μ l
5x Q-Solution	10 μ l
cDNA (100ng)	X μ l
$\Sigma =$	20 μl



Rycina 12. Profil termiczny reakcji PCR.

Reakcję PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzano na dwa sposoby: z użyciem odczynnika SybrGreen (Applied Biosystems), systemu 7500 Real-Time PCR Applied Biosystems i starterów lub systemu StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) i odpowiednio dobranych sond TaqMan (Life Technologies). Względną ekspresję genów oceniano metodą delta delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Profil termiczny reakcji przedstawiono na rycinie 13.



Rycina 13. Profil termiczny reakcji PCR w czasie rzeczywistym z zastosowaniem odczynnika Sybr Green.

Produkty reakcji amplifikacji były rozdzielane w 1,5% żelu agarozowym (Prona Agarose) i wizualizowane za pomocą bromku etydyny (Sigma-Aldrich). Stosowane startery i sondy TaqMan zebrano w tabelach 3 i 4.

Do reakcji PCR w czasie rzeczywistym używano starterów oznaczonych w tabeli 3 gwiazdką (*). Startery te zostały tak dobrane, aby możliwe było uzyskanie produktów o mniejszej długości - lepszych do tego typu reakcji.

Tabela 3. Sekwencje starterów stosowanych w reakcji PCR i PCR w czasie rzeczywistym (*) z zaznaczeniem długości powstających produktów.

Nazwa genu	Starter	Sekwencja	Długość produktu (pz)
<i>OCT^{3/4}</i>	F	CTCCTGGAGGGCCAGGAATC	381
	R	CCACATCGGCCTGTGTATAT	
<i>OCT^{3/4}*</i> / <i>POU5F1</i>	F	GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG	144
	R	CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC	
<i>SOX 2</i>	F	ACACCAATCCCATCCACACT	224
	R	GCAAAC TCCCTGCAAAGCTC	
<i>NANOG</i>	F	TCCAGGATTTTAACGTTCTGCT	580
	R	TTCTTGCATCTGCTGGAGGC	
<i>NANOG*</i>	F	AATACCTCAGCCTCCAGCAGATG	148
	R	TGCGTCACACCATTGCTATTCTTC	
<i>ZFP42 / REX 1</i>	F	GCTGCCCTGAGAAAGCATCT	289
	R	GCGTTAGGATGTGGGCTTTC	
<i>B- TUBULINA III</i>	F	CTCAGGGGCCTTGGACATC	159
	R	CAGGCAGTCGCAGTTTTTAC	
<i>NF 200 / NFH</i>	F	GAGGAACACCAAGTGGGAGA	160
	R	TTCTGGAAGCGAGAAAGGAA	
<i>MAP2</i>	F	CAGGTGGCGGACGTGTGAAAATTGAGA GTG	212
	R	CACGCTGGATCTGCCTGGGGACTGTG	
<i>MAP2*</i>	F	CTGCTTTACAGGGTAGCACAA	135
	R	TTGAGTATGGCAAACGGTCTG	
<i>OLIG 1</i>	F	TTGCATCCAGTGTTCCTGATTTAC	390
	R	TGCCAGTTAAATTCGGCTACTACC	
<i>OLIG 2</i>	F	CAGAAGCGCTGATGGTCATA	208
	R	TCGGCAGTTTTGGGTTATTC	
<i>PDGFRα</i>	F	ATCAATCAGCCCAGATGGAC	891
	R	TTCACGGGCAGAAAGGTACT	

Nazwa genu	Starter	Sekwencja	Długość produktu (pz)
<i>GFAP</i>	F	GGCCCGCCACTTGCAGGAGTACCAGG	328
	R	CTTCTGCTCGGGCCCCTCATGAGACG	
<i>HIF 1a</i>	F	CCAGCAGACTCAAATACAAGAACC	138
	R	TGTATGTGGGTAGGAGATGGAGAT	
<i>HIF 2a/ EPAS 1</i>	F	GGGCCAGGTGAAAGTCTACA	105
	R	TGCTGGATTGGTTCACACAT	
<i>HIF 3a</i>	F	TGGAGCTGCTGGGAGTGAGA	158
	R	GGGCTCATTCAGGTTCAAGGAGT	
<i>DNMT 3a</i>	F	CCTGTGGGAGCCTCAATGTTA	70
	R	TTCTTGCAGTTTTGGCACATTC	
<i>DNMT 3b</i>	F	GACTCGAAGACGCACAGCTG	98
	R	CTCGGTCTTTGCCGTTGTTATAG	
<i>HDAC 1</i>	F	ACCGGGCAACGTTACGAAT	102
	R	CTATCAAAGGACACGCCAAGTG	
<i>HDAC 2</i>	F	TCATTGGAAAATTGACAGCATAGT	151
	R	CATGGTGATGGTGTGGAAGAAG	
<i>β-aktyna (ACTB)</i>	F	GCCAACCGCGAGAAGATGA	120
	R	CATCACGATGCCAGTGGTA	

Startery użyte w doświadczeniu zostały zsyntetyzowane w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów IBB PAN (<http://oligo.ibb.waw.pl/>), natomiast sondy TaqMan (Applied Biosystems™ TaqMan™ Assays) zostały dobrane i zamówione w Thermo Fisher Scientific.

Tabela 4. Stosowane sondy TaqMan.

Nazwa Genu	Nazwa Sondy
<i>NANOG</i>	Hs04399610_g1
<i>POU5F1 (OCTA)</i>	Hs00999634_gH
<i>MAP2</i>	Hs00258900_m1
<i>PDGFRα</i>	Hs00998018_m1
<i>S100β</i>	Hs00902901_m1
<i>OLIG2</i>	Hs00377820_m1
<i>HIF 1α</i>	Hs00153153_m1
<i>HIF 2α</i>	Hs01026149_m1
<i>DNMT 3A</i>	Hs01027166_m1
<i>DNMT 3B</i>	Hs00171876_m1
<i>HDAC 1</i>	Hs02621185_s1
<i>HDAC 2</i>	Hs00231032_m1
<i>B-AKTYNA</i>	Hs99999903_m1

3.4 Analiza immunocytochemiczna i analiza obrazu za pomocą mikroskopii konfokalnej

Komórki utrwalano w 4% PFA, a następnie blokowano i permeabilizowano w roztworze 10% NGS (ang. *Normal Goat Serum*) z dodatkiem 0,25% Tritonu X-100 (Sigma Aldrich) w PBS. Stosowano następujące przeciwciała I-rzędowe: beta-TUBULINA III (mysie IgG2a, 1:1000, Sigma Aldrich), TUJ (mysie IgG2b, 1:500, Covance), MAP2 (mysie IgG1, 1:500, Sigma Aldrich), NF200 (mysie IgG1, 1:400, Sigma Aldrich), NG2 (mysie IgG1, 1:200, Santa Cruz), GalC (mysie IgG3, 1:300, Millipore) S-100 β (królicze poliklonalne IgG, 1:500, Swant), GFAP (królicze poliklonalne IgG, 1:200, Cappel), Ki67 (mysie IgG1, 1:500, Leica/Novocastra), OCT4

(mysie IgG2b, 1:200, Santa Cruz), SOX2 (królicze poliklonalne IgG, 1:200, Santa Cruz), NANOG (królicze poliklonalne IgG, 1:200, Abcam), HIF 1 α (mysie IgG1, 1:200, Abcam), HIF 2 α (królicze poliklonalne IgG, 1:200, Abcam).

Po całonocnej inkubacji w 4°C przeciwciała I-rzędowe odpłukiwano roztworem PBS i nakładano odpowiednie przeciwciała II-rzędowe (Alexa Fluor 488 lub 546, Life Technologies). Inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej (RT). W przypadku znakowań podwójnych nakładano kolejne przeciwciała I i II-rzędowe, stosując analogiczną procedurę. Następnie wybarwiano jądra komórkowe przy pomocy Hoechst 33258 (15 min, RT). Preparaty przenoszono na szkiełka mikroskopowe i zamykano za pomocą Fluorescence Mounting Medium (Dako). Preparaty analizowano w Środowiskowym Laboratorium Laserowych Technik Mikroskopowych (IMDiK PAN) przy użyciu mikroskopu konfokalnego (LSM 510, LSM 780) i oprogramowania ZEN (Zeiss). Do liczenia komórek Ki67-pozytywnych wykorzystywano oprogramowanie ImageJ pobrane ze strony National Institutes of Health (NIH) (<https://imagej.nih.gov/ij>).

3.5 Analiza zasiedlenia badanych rusztowań komórkami HUCB-NSC z zastosowaniem elektronowego mikroskopu skaningowego

Komórki rosnące na rusztowaniach były utrwalane przez 24 godziny w temperaturze 4°C za pomocą roztworu 2% PFA z 2,5% glutaraldehydem w buforze kakodylanowym (pH 7,2-7,4). Następnie płukane trzykrotnie w buforze kakodylanowym i utrwalane dodatkowo 2% czterotlenkiem osmu (OsO₄) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Odwadnianie w szeregu acetonów o wzrastającym stężeniu (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96% i 100%) było poprzedzone trzykrotnym płukaniem w buforze kakodylanowym. Następnie próby były suszone w punkcie krytycznym za pomocą ciekłego dwutlenku węgla, naklejane na stoliku aluminiowym i napyłane metalem szlachetnym. Technika suszenia w punkcie krytycznym polega na wykorzystaniu właściwości CO₂, który w punkcie krytycznym przechodzi ze stanu płynnego w gazowy, nie powodując uszkodzenia preparatów, zapewniając lepszą jakość uzyskiwanych preparatów. Preparaty były analizowane w Środowiskowym Laboratorium Mikroskopii Elektronowej (IMDiK PAN) przy pomocy elektronowego mikroskopu skaningowego JSM-6390LV (JEOL).

3.6 Analiza statystyczna

Analiza statystyczna została wykonana w programie GraphPad Prism przy użyciu testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), z testem wielokrotnych porównań Bonferroniego. Różnice były uznawane za istotne statystycznie, gdy wartość $p < 0,05$. Gwiazdki na wykresach oznaczają poziom istotności statystycznej: * - dla p mieszczącego się w przedziale $0,01 < p < 0,05$; ** - dla $0,001 < p < 0,01$; ***- dla $0,0001 < p < 0,001$, **** gdy $p < 0,0001$.

4. WYNIKI

Wyniki zostały podzielone na trzy części.

W pierwszej z nich (4.1.) przedstawiono wpływ atmosferycznego (21%) i obniżonego (5%) poziomu tlenu na komórki HUCB-NSC znajdujące się na różnych etapach rozwoju (komórki niezróżnicowane, progenitorowe i różnicowane w kierunku neuronalnym). Oceniano ekspresję genów związanych z różnicowaniem, odpowiedzią na hipoksję oraz modyfikacjami epigenetycznymi, a także proliferację komórek. Ponadto w tej części oceniano wpływ akumulacji białka HIF1 α wynikający z zastosowania inhibitora hydroksylazy prolinowej – DMOG na wyżej wymienione markery określonych procesów życiowych.

W części drugiej (4.2.) komórki progenitorowe poddano działaniu związków niskocząsteczkowych: TSA, RG 108, PD 0325901 i SB 431542. Związki te wpływają na komórkowe szlaki sygnałowe lub na enzymy odpowiedzialne za modyfikacje epigenetyczne. Oceniano tu odpowiedź komórek (wpływ na różnicowanie i proliferację) na ww. substancje i różne warunki tlenowe w hodowli.

Część trzecia (4.3.) polegała na ocenie możliwości zastosowania czterech typów rusztowań trójwymiarowych do hodowli HUCB-NSC. Sprawdzano wpływ hodowli przestrzennej i zastosowanych biomateriałów na różnicowanie i proliferację komórek progenitorowych.

Wybór populacji komórek z określonego etapu rozwojowego, użytych w doświadczeniach z zastosowaniem związków niskocząsteczkowych i rusztowań trójwymiarowych (4.2 i 4.3) był uzależniony od wyników uzyskanych w pierwszym etapie doświadczeń. Wybrano komórki wykazujące zdolność do proliferacji i wielokierunkowego różnicowania: stadium progenitorów neuralnych (pożywka LS).

4.1. Ocena wpływu warunków tlenowych na proliferację i różnicowanie HUCB-NSC na różnych etapach rozwoju

Przeprowadzono analizę ekspresji genów rozwojowych i genów odpowiedzi na hipoksję oraz enzymów epigenetycznych w standardowej hodowli 2D komórek HUCB-NSC na różnych etapach rozwoju (hodowle SF, LS oraz LS + dBcAMP) w dwóch

wariantach tlenowych: atmosferycznym (21% O₂) i obniżonym – odpowiadającym warunkom fizjologicznej normoksji (5% O₂).

Badania wstępne wykazały istotny wpływ stężenia tlenu w hodowli na proces różnicowania i proliferacji komórek, ale jednocześnie różny w zależności od stadium rozwojowego komórek. Zastosowano inhibitor hydroksylazy prolinowej – DMOG, który powoduje akumulację białek HIF w cytoplazmie badanych komórek, w celu sprawdzenia, czy odpowiedź komórek na różne warunki tlenowe jest zależna od czynników HIF.

4.1.1. Analiza ekspresji wybranych genów rozwojowych, genów kodujących enzymy epigenetyczne oraz czynników HIF na poziomie mRNA

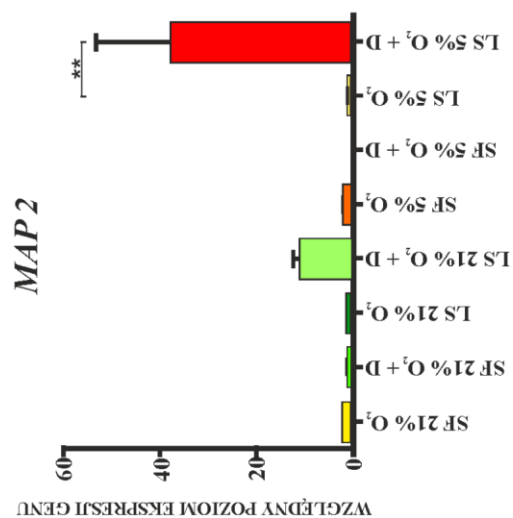
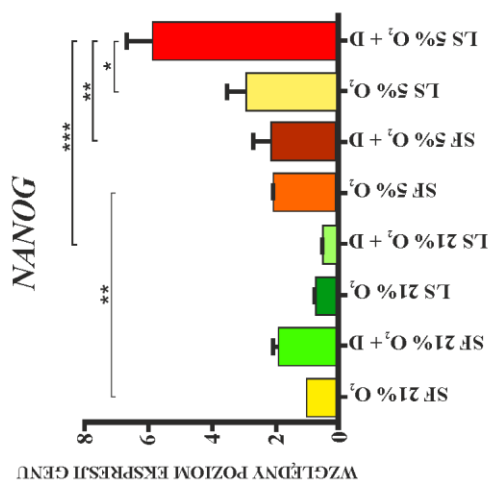
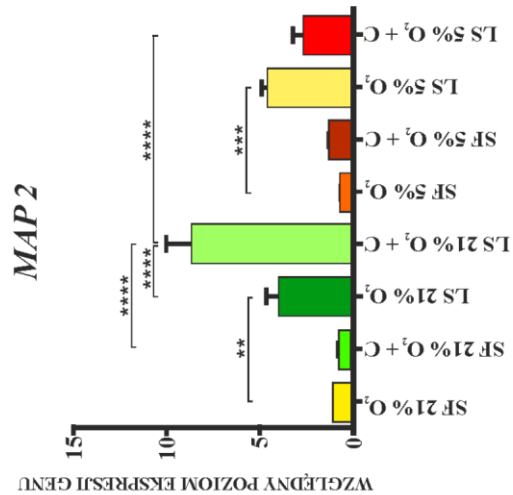
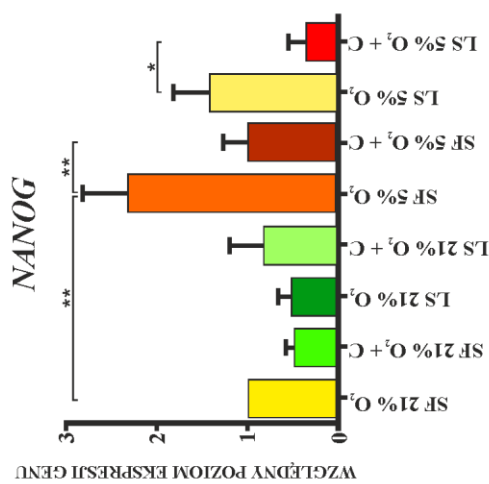
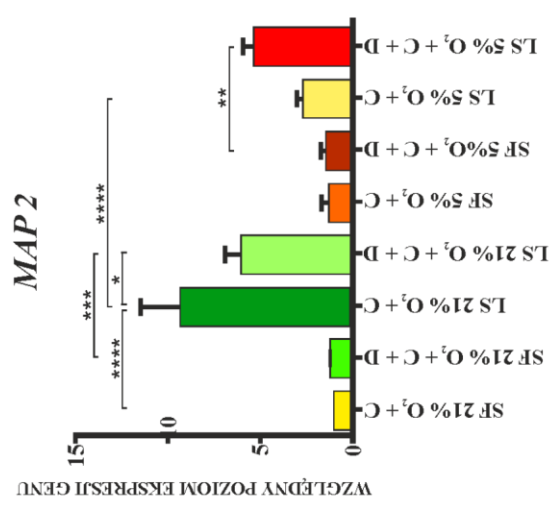
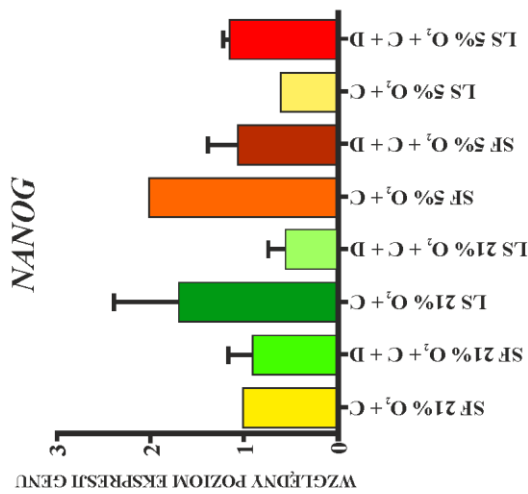
W hodowlach rosnących 14 dni w 21% i w 5% warunkach tlenowych przeprowadzono ocenę ekspresji genów na poziomie mRNA (RT-PCR): *OCT3/4 (A)*, *SOX2*, *NANOG* (markery charakterystyczne dla stanu pluripotencjalności), β -*TUBULINA III*, *NF200*, *MAP2*, *GFAP* (różnicowanie neuralne), *DNMT3A*, *DNMT3B*, *HDAC1*, *HDAC2* (geny kodujące enzymy epigenetyczne), *HIF1 α* , *HIF2 α* , *HIF3 α* (geny związane z hipoksją). Wyniki przedstawiające obecność lub brak ekspresji ww. genów zestawione są w tabeli 5-tej. Do każdej reakcji RT-PCR używano 100 ng matrycy cDNA.

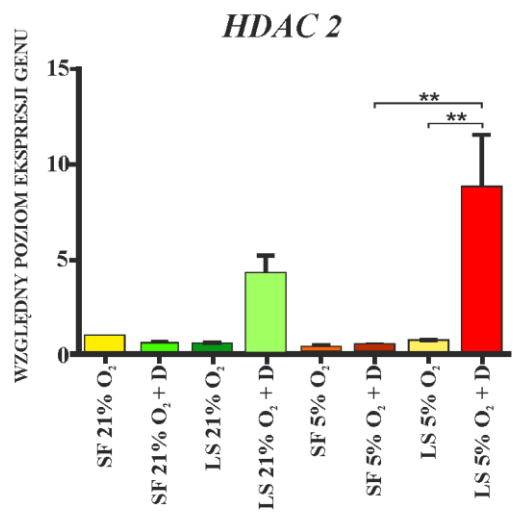
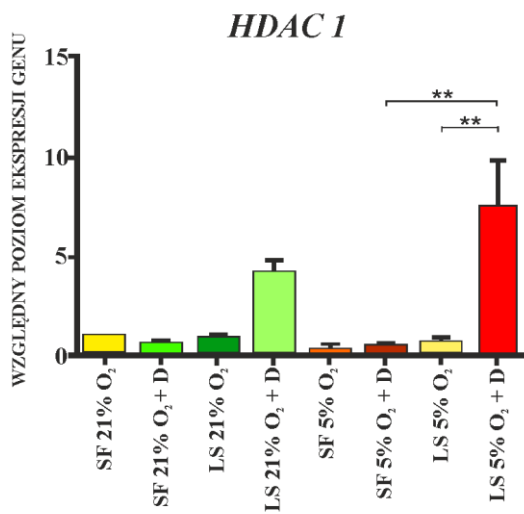
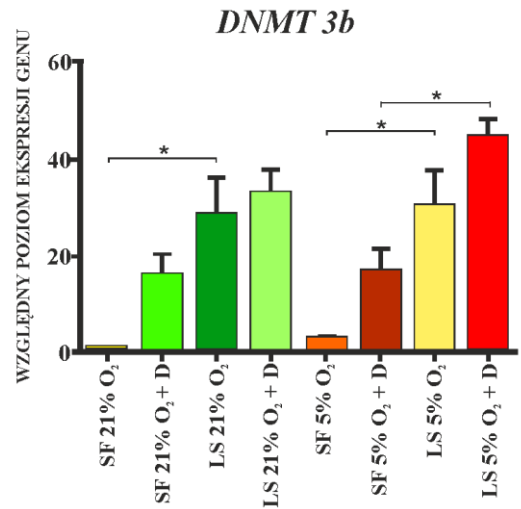
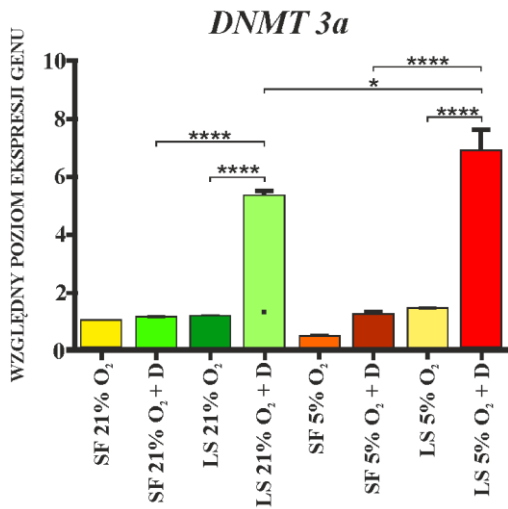
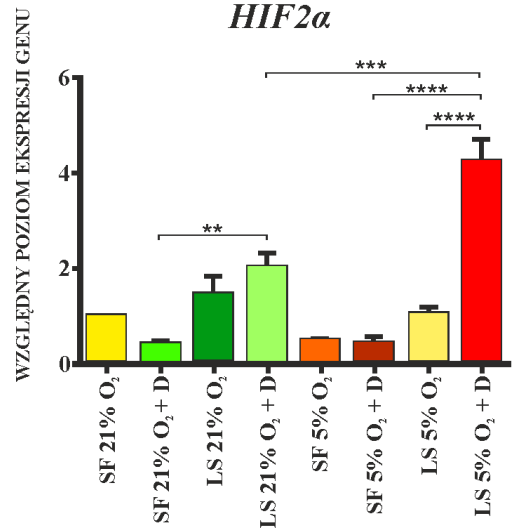
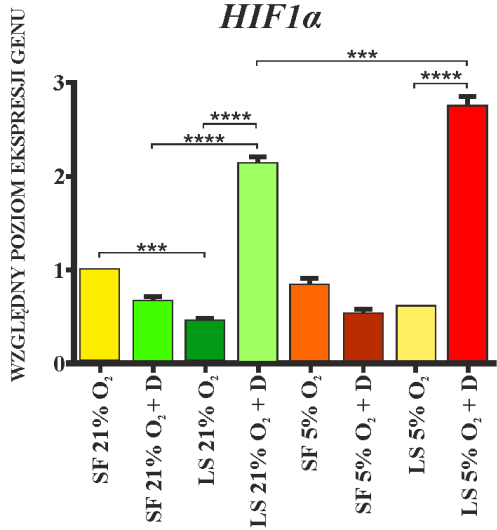
W celu określenia różnic ilościowych w poziomie ekspresji wybranych (spośród badanych) genów, zastosowano metodę RT-PCR w czasie rzeczywistym i przeprowadzono analizę statystyczną wyników. Wykresy przedstawiające poziom ekspresji genów *NANOG*, *MAP2*, *HIF1 α* , *HIF2 α* , *DNMT3A*, *DNMT3B*, *HDAC1* i *HDAC2* zestawione są na rycinie 14.

Tabela 5. Analiza ekspresji badanych genów w komórkach HUCB-NSC będących na różnych stadiach rozwojowych - wpływ różnych warunków tlenowych (*).

	LS 21%O ₂	LS 21%O ₂ +C	LS 21%O ₂ +D	LS 21%O ₂ +C+D	SF 21%O ₂	SF 21%O ₂ +C	SF 21%O ₂ +D	SF 21%O ₂ +C+D	LS 5%O ₂	LS 5%O ₂ +C	LS 5%O ₂ +D	LS 5%O ₂ +C+D	SF 5%O ₂	SF 5%O ₂ +C	SF 5%O ₂ +D	SF 5%O ₂ +C+D
Geny charakterystyczne dla stanu pluripotencjalności																
<i>OCT3/4 (A)</i>	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	+	+
<i>SOX2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>NANOG</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-	-
Geny związane z różnicowaniem neuralnym																
<i>β-TUB III</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>MAP2</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>NF200</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>GFAP</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Czynniki Indukowane Hipoksją																
<i>HIF1α</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>HIF2α</i>	+/-	+	+/-	+	-	-	+/-	+/-	-	-	+/-	+	+	+	+	+
<i>HIF3α</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geny związane z modyfikacjami epigenetycznymi																
<i>DNMT3 A</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>DNMT3 B</i>	+/-	-	+/-	-	+/-	+/-	+	+/-	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>HDAC1</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>HDAC2</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>β-AKTYN A</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* Materiał użyty do oceny ekspresji genów pochodził przynajmniej z trzech niezależnie przeprowadzonych doświadczeń, a każdą analizę powtarzano co najmniej w trzech powtórzeniach. Oznaczenie +/- wskazuje, że zaobserwowano ekspresję danego genu w części wykonywanych powtórzeń.





Rycina 14. Porównanie poziomu ekspresji genów: *NANOG*, *MAP2*, *HIF1 α* , *HIF2 α* , *DNMT3A*, *DNMT3B*, *HDAC1*, *HDAC2* w komórkach *HUCB-NSC* będących na różnych etapach rozwoju, hodowanych w warunkach 5 lub 21% stężenia tlenu, z dodatkiem lub bez inhibitora *DMOG* (D). Wykresy przedstawiają wyniki uzyskane metodą RT-PCR w czasie rzeczywistym, obliczenia wykonano metodą $\Delta\Delta C_t$. Każda z prób była normalizowana w stosunku do β -*AKTYNY* (gen referencyjny). Próby kontrolne, kalibracyjne (wartość 1) odnoszą się do ekspresji genów w warunkach SF 21% O_2 . Różnice były uznawane za istotne statystycznie, gdy wartość $p < 0,05$. Poziom istotności: * - dla p mieszczącego się w przedziale $0,01 < p < 0,05$; ** - dla $0,001 < p < 0,01$; *** - dla $0,0001 < p < 0,001$, **** - gdy $p < 0,0001$.

Porównanie ekspresji wybranych badanych genów metodą RT-PCR w czasie rzeczywistym wykazało, że:

- 5% stężenie tlenu sprzyja aktywacji genu *NANOG* w komórkach nieodróżnicowanych (różnica istotna statystycznie) i w progenitorach neuralnych, ale nie w komórkach różnicowanych neuronalnie (LS + dBcAMP),
- *DMOG* wpłynął istotnie statystycznie na wzrost ekspresji genu *NANOG*, ale tylko w hodowli na etapie progenitorów neuralnych (pożywka LS),
- progenitory neuralne różnicowane za pomocą dBcAMP (LS + dBcAMP) wykazują istotnie większą ekspresję genu *MAP2* niż komórki nieodróżnicowane (SF + dBcAMP),
- obniżenie poziomu tlenu do 5% nie wpływa na ekspresję *MAP2* w hodowli komórek nieodróżnicowanych (pożywka SF) i progenitorów neuralnych (pożywka LS), jedynie w stadium komórek ukierunkowanym neuronalnie (LS + dBcAMP) obserwujemy istotny statystycznie spadek ekspresji *MAP2*,
- spektakularny, istotny statystycznie, wzrost ekspresji genu *MAP2* zaobserwowano w progenitorach neuralnych hodowanych w 5% O_2 z dodatkiem *DMOG*,
- obniżenie stężenia tlenu nie wpłynęło na zmianę poziomu ekspresji genów HIF w kontrolnych populacjach komórek,
- *DMOG* znacząco zwiększa ekspresję genu *HIF1 α* w progenitorach neuralnych (pożywka LS) zarówno w 5% jak i 21% stężeniu tlenu, przy czym w 5% O_2 ten efekt jest istotnie większy. Ekspresja *HIF2 α* w tych komórkach istotnie zwiększyła się tylko w warunkach 5% O_2 ,

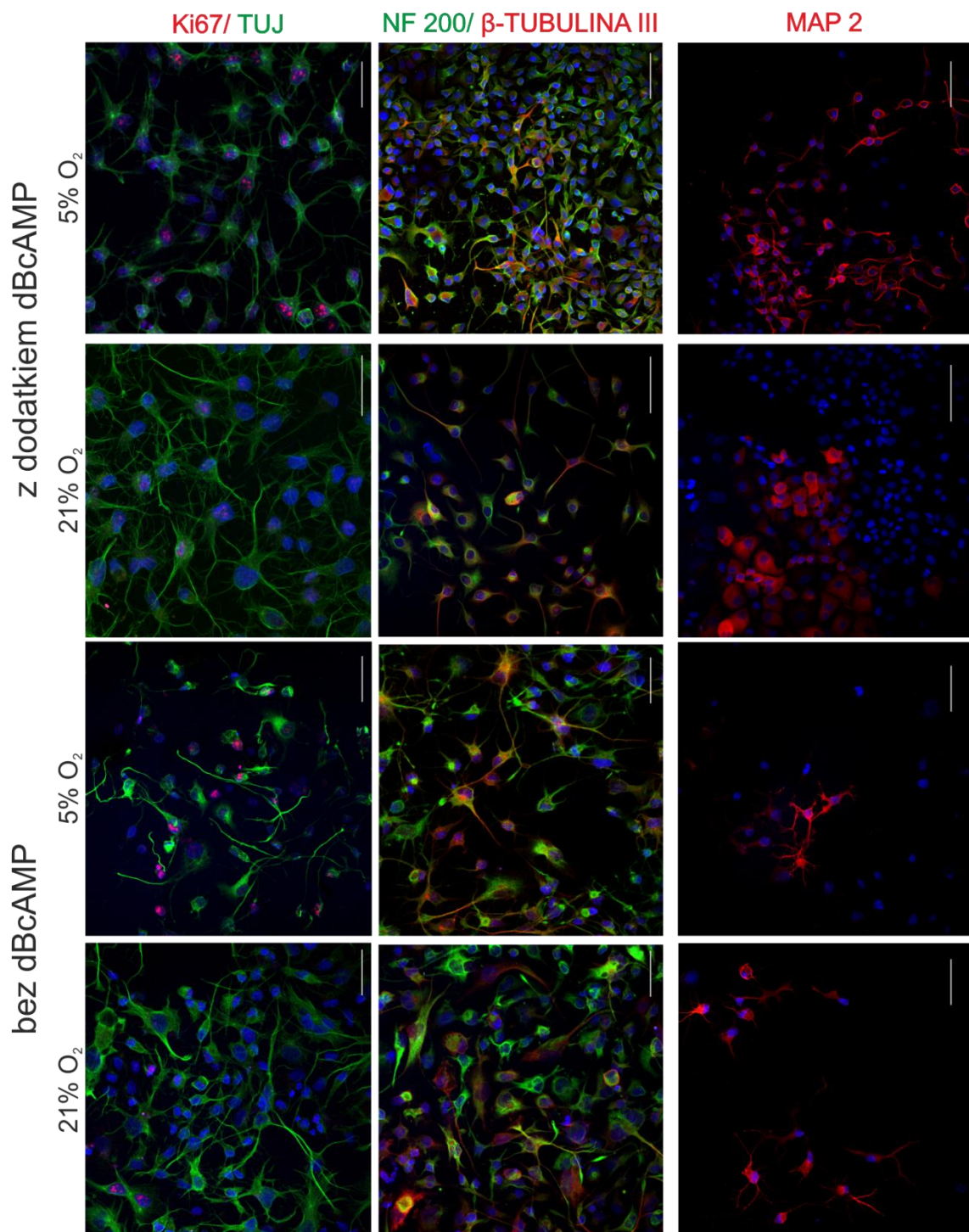
- komórki w stadium progenitorów neuralnych (LS) charakteryzowała wyższa ekspresja *DNMT3B* w porównaniu z komórkami niezróżnicowanymi (SF), ekspresja *DNMT3A*, *HDAC1*, *HDAC2* w hodowlach LS i SF są na podobnym poziomie - 5% poziom tlenu nie wpłynął na zmianę ich ekspresji,
- DMOG istotnie zwiększał ekspresję *DNMT3A*, *DNMT3B*, *HDAC1*, *HDAC2* tylko w komórkach progenitorów neuralnych (LS), dla *DNMT3A* w obydwu wariantach eksperymentalnych (21% i 5% tlenu), dla pozostałych genów tylko w warunkach obniżonego 5% poziomu tlenu.

4.1.2. Ocena ekspresji markerów proliferacji oraz różnicowania na poziomie białka

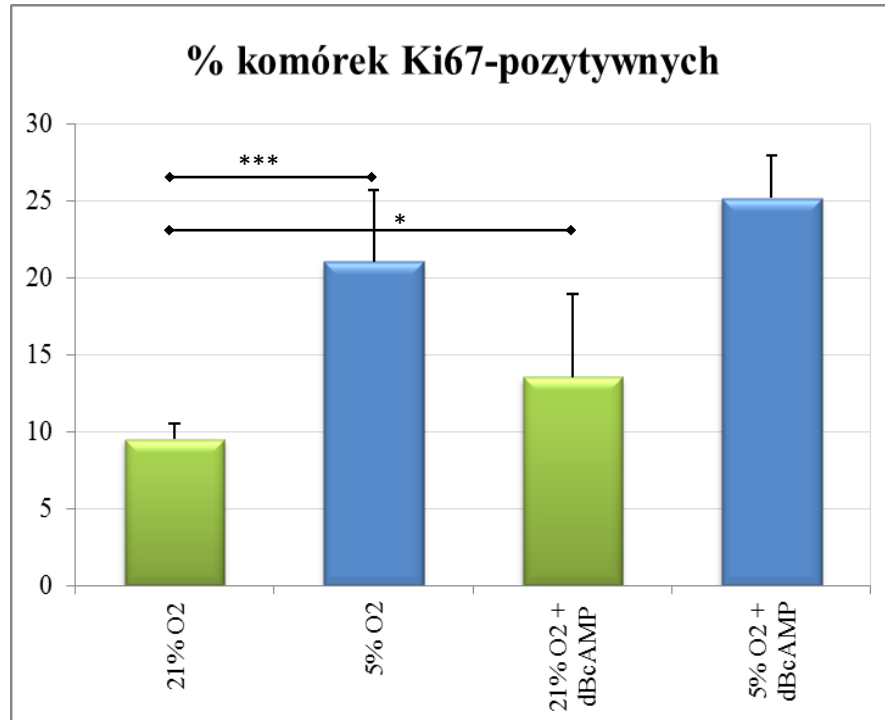
Analizę ekspresji markerów różnicowania i proliferacji na poziomie białka przeprowadzono w hodowlach przylegających – wczesnych progenitorów neuralnych (pożywka LS) i w komórkach ukierunkowanych neuronalnie (pożywka LS + dBcAMP). Oceniano ekspresję genów: β -TUBULINY III, NF200, MAP2 (markery neuronalne), GFAP, S100 β , NG2, GalC, PDGFR α (markery glejowe), Ki67 (marker komórek zdolnych do proliferacji).

Znakowanie immunocytochemiczne potwierdziło obecność markera komórek zdolnych do proliferacji - Ki67 (lokalizacja jądrowa), jak również białek typowych dla różnicowania neuronalnego (β -TUBULINY III, NF200, MAP2) (Ryc. 15). W populacji progenitorów neuralnych (pożywka LS) poza markerami neuronalnymi ekspresji podlega GFAP (kontrola, Ryc. 20). W komórkach ukierunkowanych neuronalnie (pożywka LS + dBcAMP) nie zaobserwowano ekspresji na poziomie białka markerów różnicowania glejowego: GFAP, S100 β , NG2, GalC, PDGFR α .

Wykazano, że niski poziom tlenu (5%) istotnie zwiększa zdolność do proliferacji komórek HUCB-NSC w populacji progenitorów neuralnych (pożywka LS), ale nie wpływa istotnie na proliferację w komórkach ukierunkowanych neuronalnie (Ryc. 16).



Rycina 15. Analiza immunocytochemiczna HUCB-NSC w hodowli przylegającej (pożywka LS) w warunkach 5% i 21% stężenia tlenu w obecności lub bez dodatku dBcAMP sprawdzająca ekspresję na poziomie białka takich genów jak: TUJ (zielony), β -TUBULINA III (czerwony), NF200 (zielony), MAP2 (czerwony), Ki67 (czerwony). Jądra komórkowe barwione za pomocą Hoechst 33258 (niebieski). Skala -100 μ m.



Rycina 16. Porównanie odsetka komórek zdolnych do proliferacji w populacji progenitorów neuralnych (pożywka LS) oraz populacji komórek ukierunkowanych neuronalnie (pożywka LS + dBcAMP). Różnice były uznawane za istotne statystycznie, gdy wartość $p < 0,05$. Poziom istotności statystycznej: * - dla p mieszczącego się w przedziale $0,01 < p < 0,05$; ** - dla $0,001 < p < 0,01$; ***- dla $0,0001 < p < 0,001$, **** gdy $p < 0,0001$.

4.2. Ocena wpływu badanych związków niskocząsteczkowych na proces proliferacji i różnicowania HUCB-NSC

Do dalszych badań, z zastosowaniem inhibitorów określonych dróg przekazywania sygnału i aktywności enzymów epigenetycznych wybrano frakcję progenitorów neuralnych we wczesnej fazie różnicowania (hodowla przylegająca, pożywka LS). W tych warunkach hodowli zaobserwowano najwyższy poziom ekspresji genów kodujących enzymy epigenetyczne (Ryc. 14). Zastosowane związki niskocząsteczkowe zostały tak dobrane, aby umożliwić zbadanie zależności występujących pomiędzy ekspresją genów kodujących enzymy epigenetyczne, a ekspresją czynników HIF i genów związanych z różnicowaniem komórek HUCB-NSC. Zahamowanie określonych enzymów epigenetycznych i/lub dróg przekazywania sygnału zaangażowanych w proliferację i różnicowanie ma na celu przybliżenie mechanizmu molekularnego leżącego u podstaw odpowiedzi komórek na obniżony poziom tlenu. Ponadto jest narzędziem poszukiwania optymalnych, zbalansowanych warunków do utrzymywania w hodowli *in vitro* komórek proliferujących i różnicujących się.

4.2.1. Analiza ekspresji wybranych genów rozwojowych, genów kodujących enzymy epigenetyczne oraz czynników HIF na poziomie mRNA

Komórki hodowano w pożywce LS z dodatkiem badanych związków (Ryc. 6) przez 5 dni. Następnie przeprowadzono ocenę ekspresji genów na poziomie mRNA (*OCT3/4 (A)*, *NANOG*, *SOX2*, *REX1*, *β -TUBULINA III*, *NF200*, *MAP2*, *PDGFR α* , *OLIG2*, *HIF1 α* , *HIF2 α* , *HIF3 α* , *DNMT3A*, *DNMT3b*, *HDAC1*, *HDAC2*) metodami RT-PCR i Real-Time PCR. Do każdej reakcji RT-PCR używano 100ng matrycy cDNA. Wyniki oceny ekspresji genów na poziomie mRNA przedstawione są w tabelach 6-7 i na rycinie 17. Oznaczenie +/- w tabeli 6 wskazuje, że zaobserwowano ekspresję danego genu w części z wykonywanych powtórzeń.

Tabela 6. Zestawienie wyników ekspresji genów (metoda RT-PCR) związanych z pluripotencją, różnicowaniem, hipoksją i procesami epigenetycznymi w komórkach HUCB-NSC - wpływ różnych warunków tlenowych i dodatku związków niskocząsteczkowych (*).

	HUCB-NSC (LS) 21% O ₂	HUCB-NSC (LS) 21% O ₂ + SB 431542	HUCB-NSC (LS) 21% O ₂ + PD 0325901	HUCB-NSC (LS) 21% O ₂ + RG 108	HUCB-NSC (LS) 21% O ₂ + TSA	HUCB-NSC (LS) 5% O ₂	HUCB-NSC (LS) 5% O ₂ + SB 431542	HUCB-NSC (LS) 5% O ₂ + PD 0325901	HUCB-NSC (LS) 5% O ₂ + RG 108	HUCB-NSC (LS) 5% O ₂ + TSA
Geny charakterystyczne dla stanu pluripotencjalności										
<i>OCT 3/4 (A)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-
<i>SOX2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>NANOG</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+/-	+
<i>REX1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geny związane z różnicowaniem neuralnym										
<i>β-TUB III</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-
<i>MAP2</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>NF200</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>PDGFRα</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>OLIG2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Czynniki Indukowane Hipoksją										
<i>HIF1α</i>	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+
<i>HIF2α</i>	-	+/-	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-
<i>HIF3α</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geny związane z modyfikacjami epigenetycznymi										
<i>DNMT3A</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
<i>DNMT3B</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
<i>HDAC1</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>HDAC2</i>	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+
<i>β-AKTYNA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

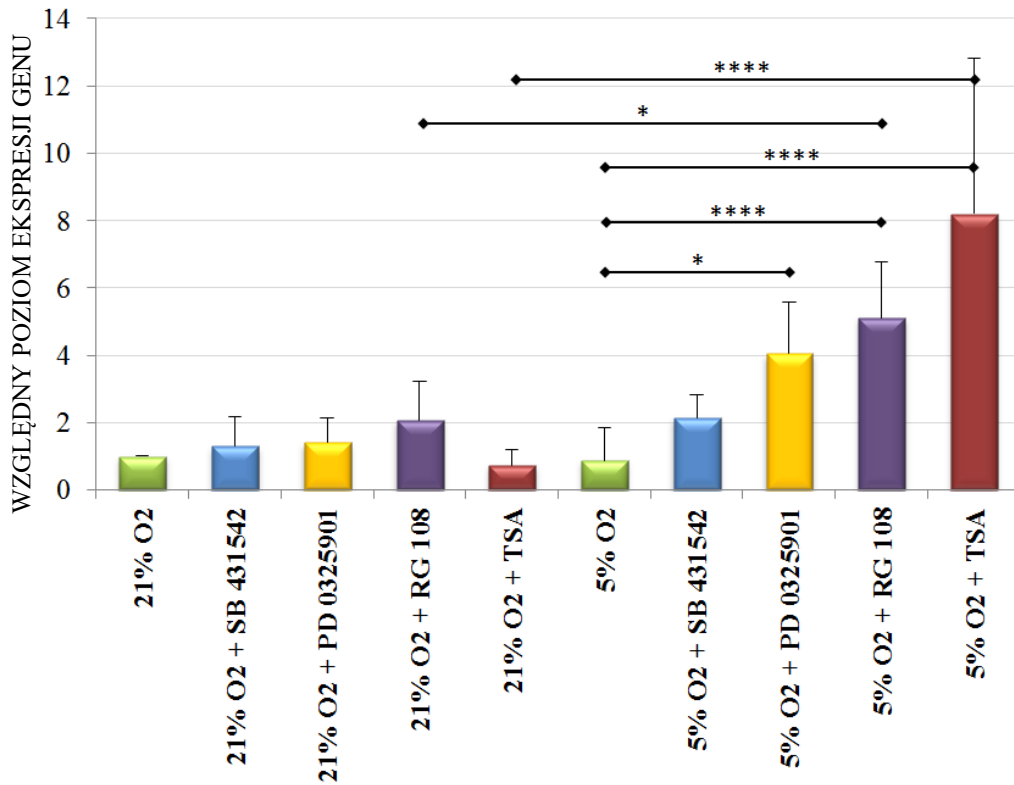
* Materiał użyty do oceny ekspresji genów (zarówno na poziomie mRNA jak i białka) pochodził przynajmniej z trzech niezależnie przeprowadzonych doświadczeń, a każdą analizę powtarzano przynajmniej trzy razy.

Badanie obecności ekspresji genów metodą RT-PCR wykazało, że:

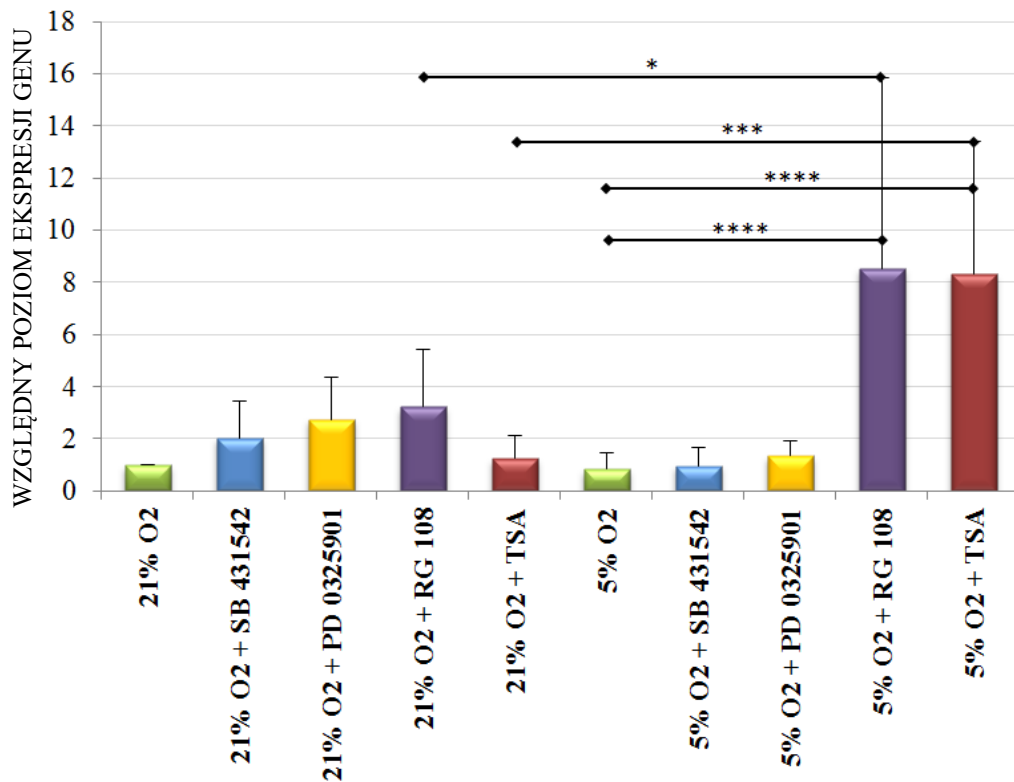
- spośród badanych genów charakterystycznych dla stanu pluripotencjalności (*OCT 3/4*, *SOX2*, *NANOG*, *REX1*) ekspresja genu *NANOG* występowała tylko w komórkach kontrolnych hodowanych w warunkach 5% O₂ oraz 5% O₂ + TSA, w niektórych powtórzeniach pojawiała się również w 5% O₂ + RG 108,
- geny różnicowania neuronalnego: *β-TUBULINA III*, *NF200* i *MAP2* podlegają ekspresji we wszystkich badanych wariantach eksperymentalnych z dwoma wyjątkami: nie wykazano ekspresji *MAP2* w obecności RG 108 i w warunkach obniżonego poziomu tlenu, natomiast *NF200* w obecności TSA i tlenu atmosferycznego,
- w badanych komórkach nie zaobserwowano ekspresji markera oligodendrocytów - *OLIG2*,
- ekspresja wczesnego markera oligodendrocytów *PDGFRα* była obecna we wszystkich badanych wariantach doświadczalnych,
- we wszystkich badanych próbach na poziomie mRNA zaobserwowano ekspresję genu *HIF1α*,
- ekspresja genu *HIF2α* była obecna we wszystkich próbach z wyjątkiem komórek hodowanych w 21% O₂,
- w badanych próbach nie zaobserwowano ekspresji genu *HIF3α*,
- dodatek PD 0325901 blokuje ekspresję genów: *DNMT3A*, *DNMT3B*, *HDAC1*, *HDAC2* jedynie w komórkach hodowanych w 21% O₂,
- obecność RG 108 w pożywce hodowlanej powoduje brak ekspresji genów: *DNMT3A* i *DNMT3b* tylko w komórkach hodowanych w 5% O₂.

Ocena poziomu ekspresji genów metodą PCR w czasie rzeczywistym dotyczyła genów związanych z pluripotencją / różnicowaniem (*OCTA*, *NANOG*, *β-TUBULINA III*, *MAP2*, *PDGFRα*, *SI00β*), hipoksją (*HIF1α*, *HIF2α*) i modyfikacjami epigenetycznymi (*DNMT3A*, *DNMT3B*, *HDAC1*, *HDAC2*). Uzyskane wyniki przedstawione są na rycinie 17.

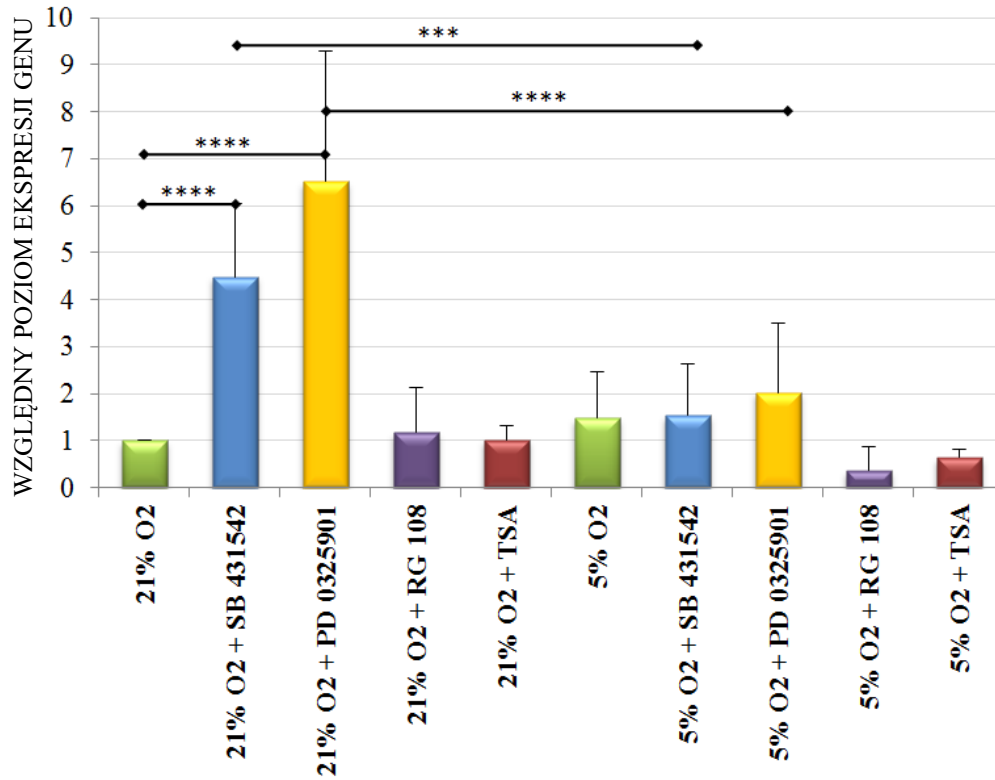
NANOG



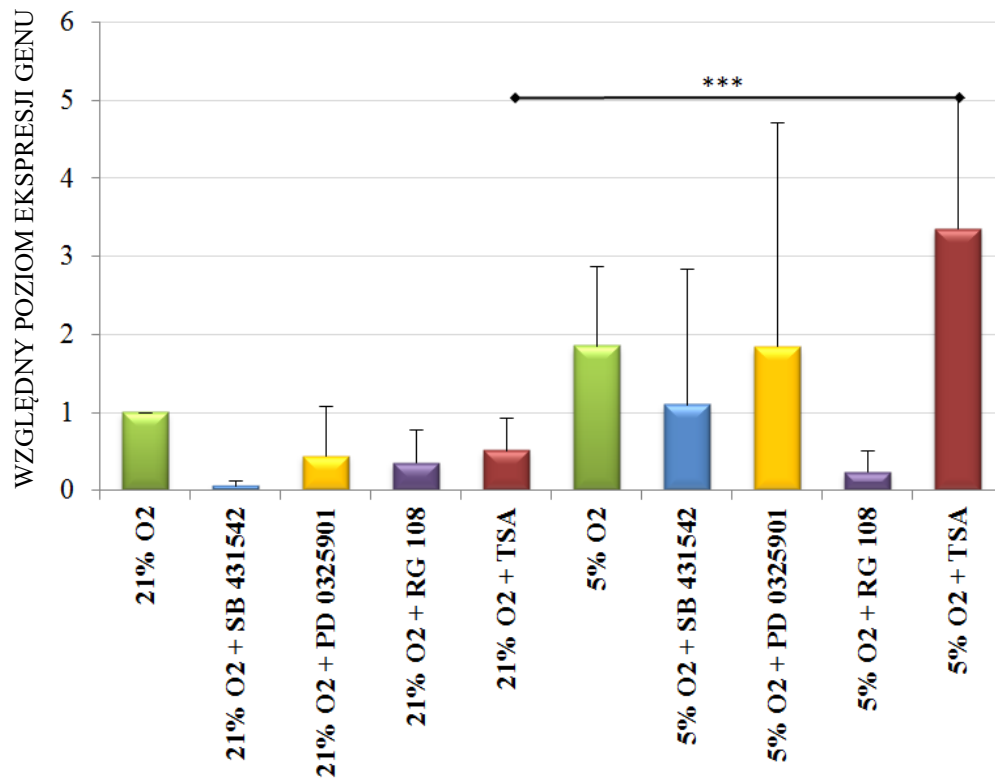
OCTA



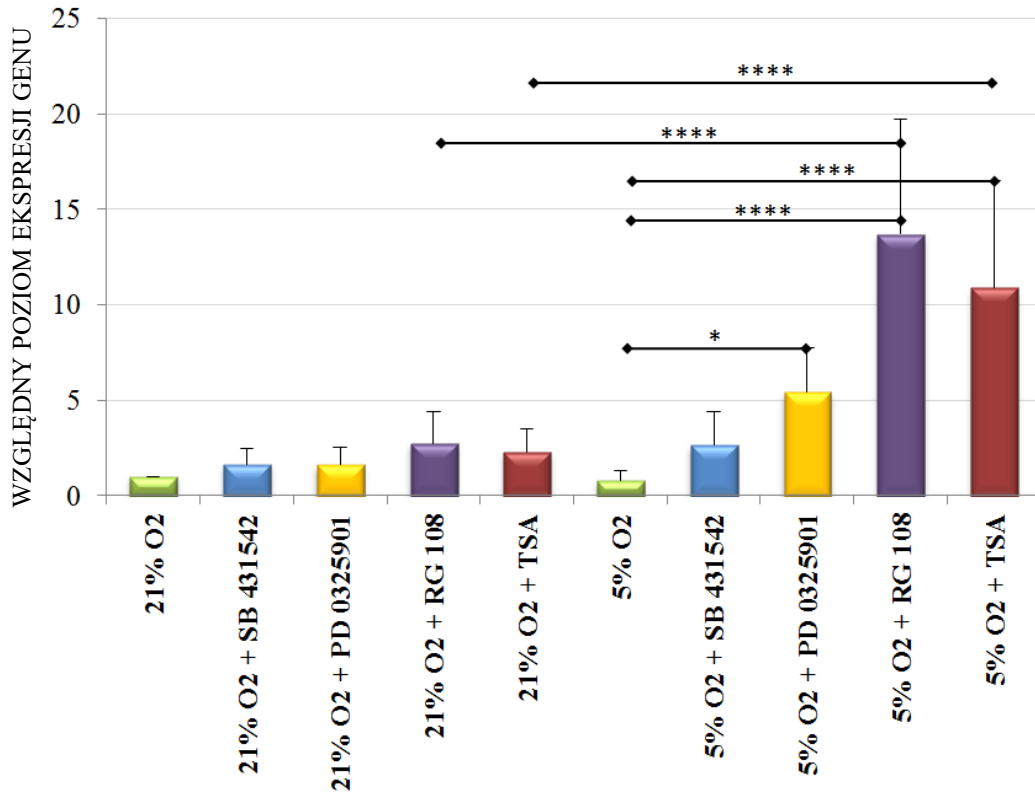
β -TUBULINA III



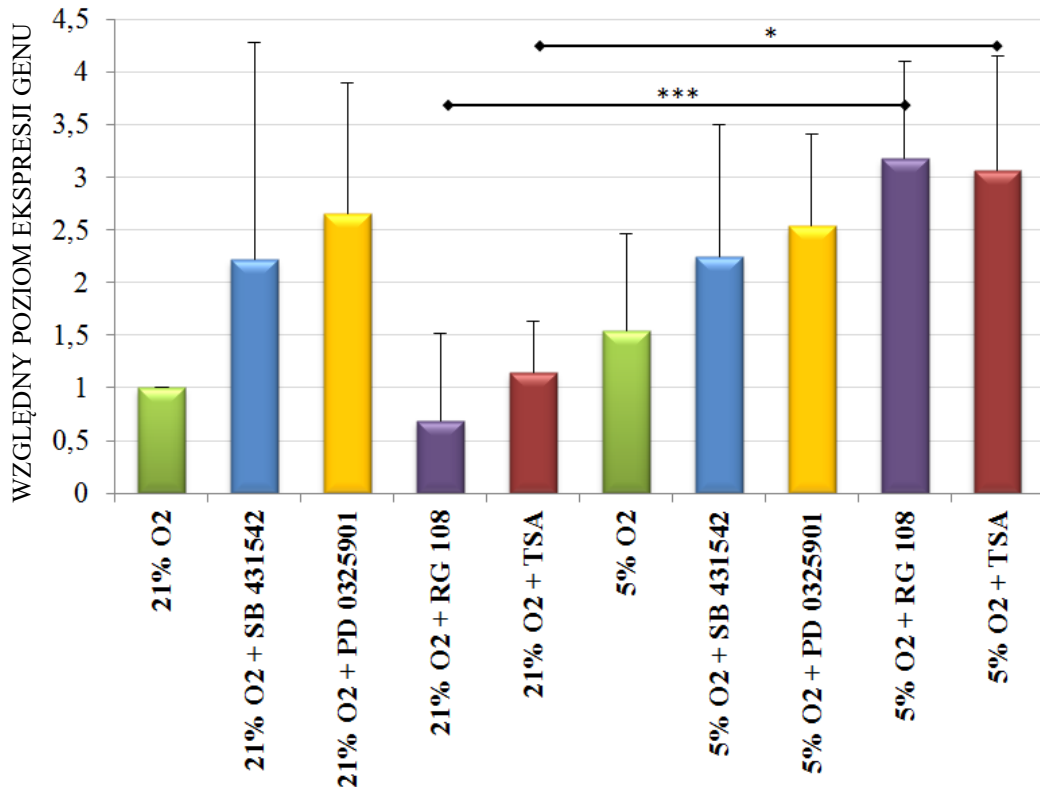
MAP 2



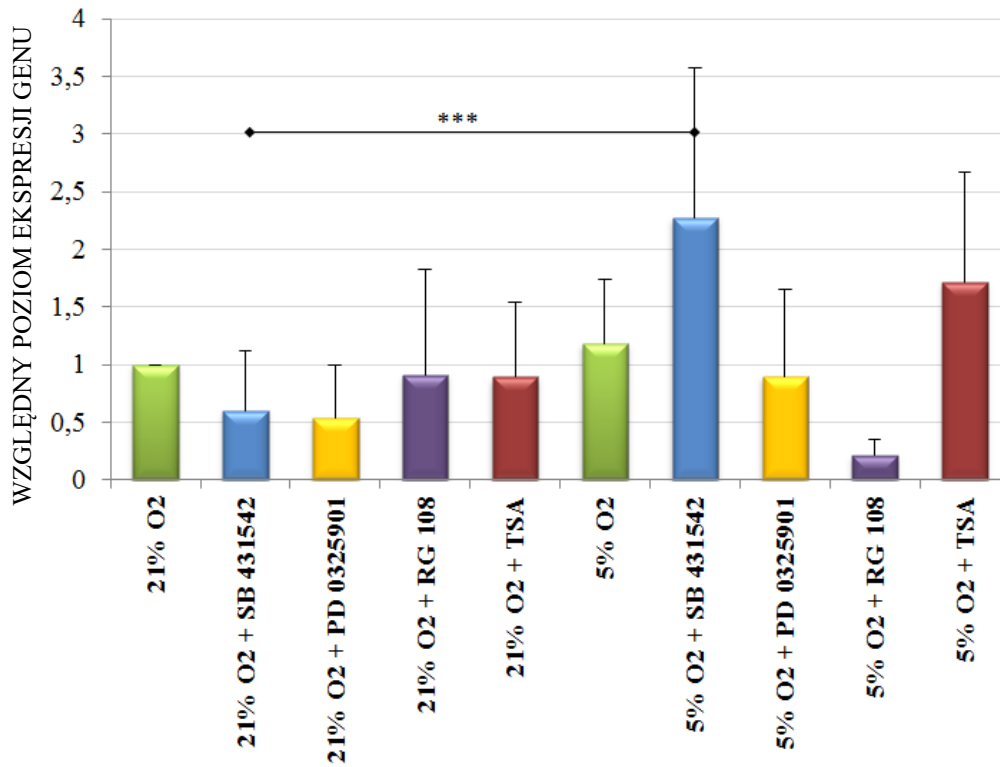
PDGFR α



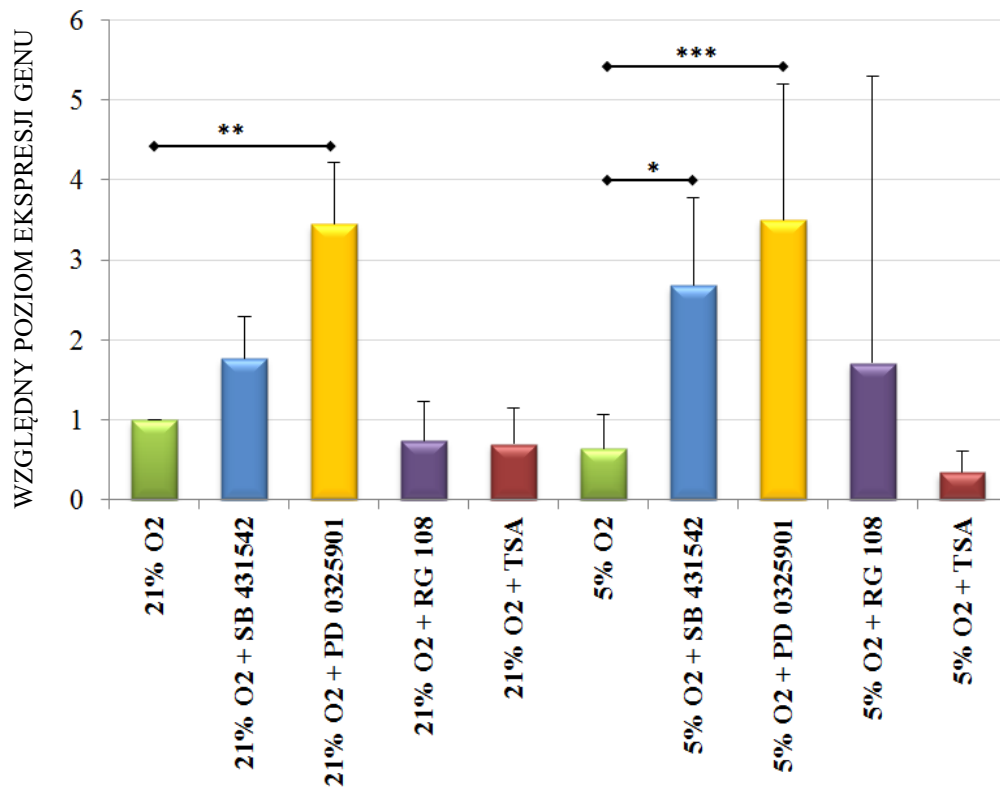
S100 β



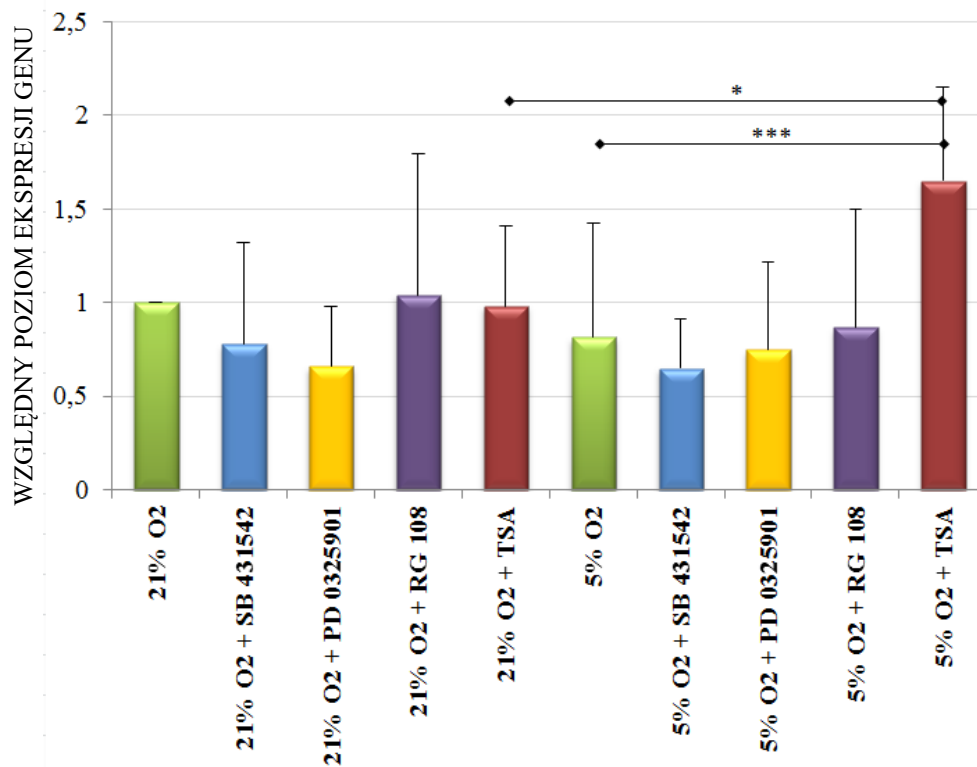
HIF1 alpha



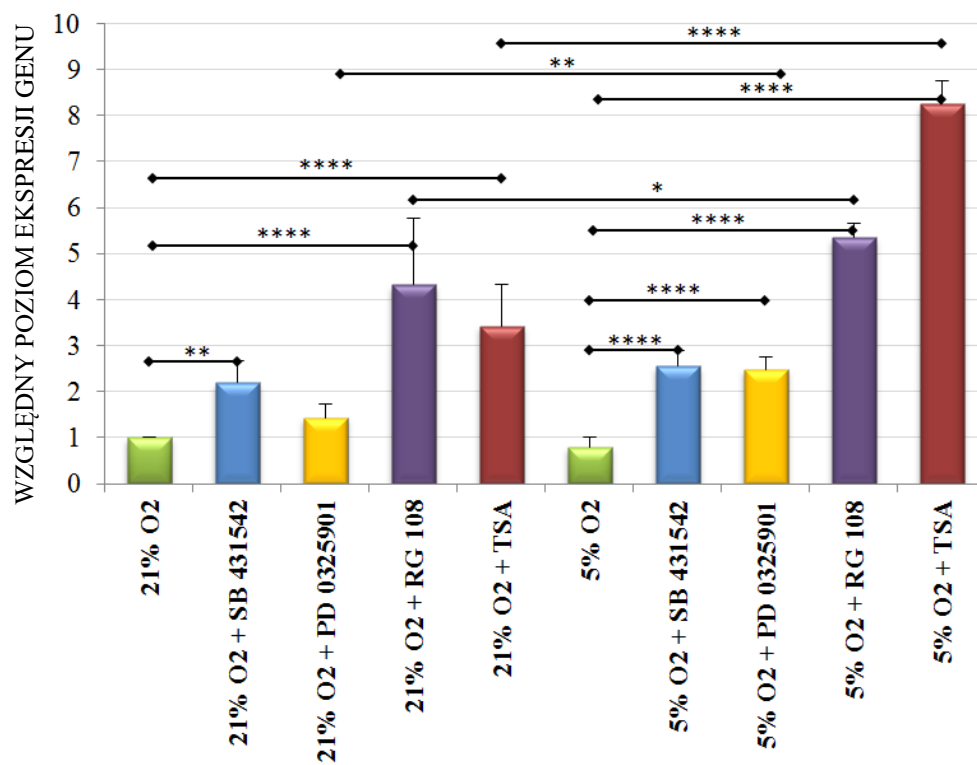
HIF2 alpha



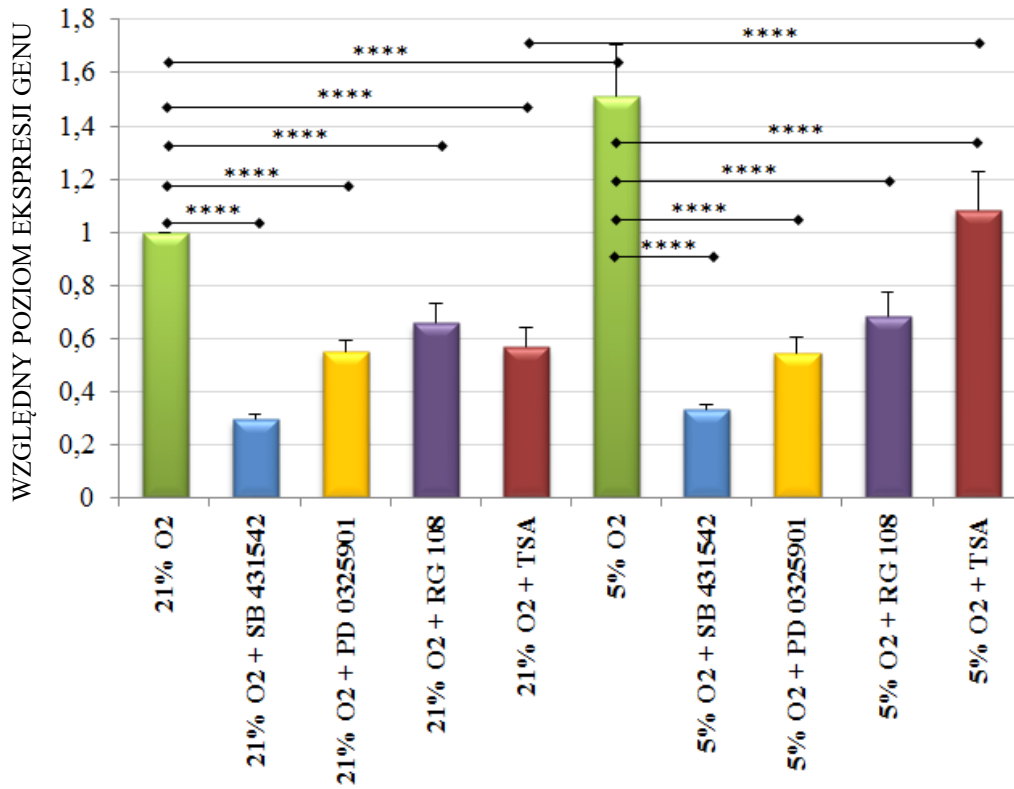
HDAC1



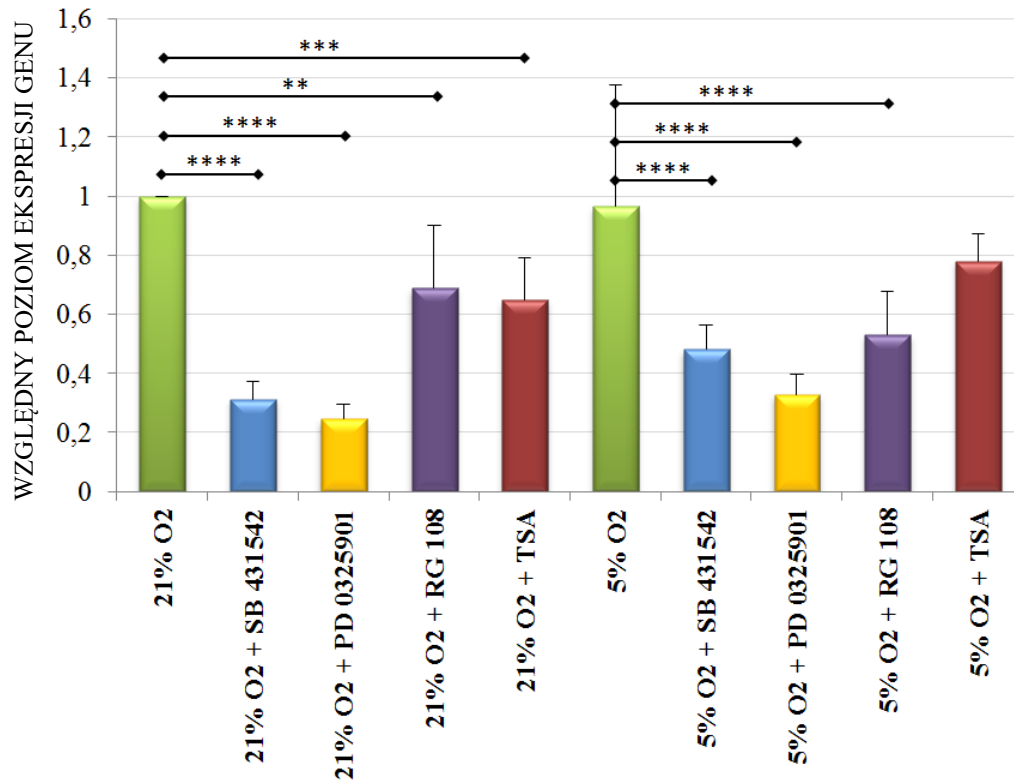
HDAC2



DNMT3a



DNMT3b



Rycina 17. Porównanie poziomu ekspresji genów: *OCTA*, *NANOG*, β -*TUBULINA III*, *MAP2*, *PDGFR α* , *SI00 β* , *HIF1 α* , *HIF2 α* , *DNMT3A*, *DNMT3B*, *HDAC1*, *HDAC2* w komórkach *HUCB-NSC* hodowanych w 5 lub 21% O_2 z dodatkiem jednego z badanych związków (*SB 431542*, *PD 0325901*, *RG 108*, *TSA*). Wykresy przedstawiają wyniki uzyskane metodą RT-PCR w czasie rzeczywistym, obliczenia wykonano metodą $\Delta\Delta Ct$. Każda z prób była normalizowana w stosunku do β -*AKTYNY* (gen referencyjny). Próby kontrolne, kalibracyjne (wartość 1) odnoszą się do ekspresji genów w warunkach 21% O_2 . Różnice były uznawane za istotne statystycznie, gdy wartość $p < 0,05$. Poziom istotności: * - dla p mieszczącego się w przedziale $0,01 < p < 0,05$; ** - dla $0,001 < p < 0,01$; ***- dla $0,0001 < p < 0,001$, **** gdy $p < 0,0001$.

Porównanie ekspresji badanych genów metodą PCR w czasie rzeczywistym wykazało, że:

- dodatek [SB 431542](#)
 - nie zmienia w znaczący sposób ekspresji genów związanych z pluripotencjalnością komórek (*NANOG*, *OCTA*),
 - w istotny sposób zwiększa ekspresję β -*TUBULINY III* w komórkach hodowanych w 21% O_2 , równocześnie nie zmieniając ekspresji tego genu w 5% O_2 ,
 - nie zmienia ekspresji genów *MAP2*, *PDGFR α* , *SI00 β* w żadnym ze stosowanych warunków tlenowych,
 - nie zmienia istotnie ekspresji genu *HIF1 α* w stosunku do komórek kontrolnych, jednakże możemy zaobserwować wyraźne zwiększenie ekspresji *HIF1 α* w komórkach hodowanych w 5% O_2 z dodatkiem tego związku w stosunku do komórek hodowanych w 21% O_2 ,
 - zwiększa ekspresję *HIF2 α* w obu wariantach tlenowych, przy czym w 5% O_2 jest to zmiana istotna statystycznie,
 - nieznacznie zmniejsza ekspresję *HDAC1* i istotnie zwiększa ekspresję *HDAC2* w obu wariantach tlenowych,
 - istotnie zmniejsza ekspresję obu metylotransferaz DNA (*DNMT3A*, *DNMT3B*) zarówno w 5% jak i 21% O_2 .
- dodatek [PD 0325901](#)
 - istotnie zwiększa ekspresję *NANOG* tylko w 5% O_2 ,
 - nie wpływa na ekspresję *OCTA* w żadnym ze stosowanych warunków tlenowych,

- w sposób znaczący zwiększa ekspresję *β-TUBULINY III* w komórkach hodowanych w 21% O₂, zmiana taka nie jest obserwowana w przypadku hodowli w 5% O₂,
 - nie zmienia w istotny sposób ekspresji *MAP2* i *SI00β* w badanych wariantach tlenowych,
 - zwiększa ekspresję *PDGFRα* w przypadku komórek hodowanych w 5% O₂,
 - nie wpływa na ekspresję *HIF1α*, równocześnie znacznie zwiększając ekspresję *HIF2α* w obu wariantach tlenowych,
 - nie zmienia poziomu ekspresji *HDAC1* i *HDAC2* w przypadku komórek hodowanych w 21% O₂, ale wyraźnie zwiększa ekspresję *HDAC2* w hodowli z 5% O₂,
 - istotnie zmniejsza ekspresję obu metylotransferaz DNA (*DNMT3A*, *DNMT3B*) zarówno w 5% jak i 21% O₂.
- dodatek RG 108
 - istotnie zwiększa ekspresję obu badanych genów typowych dla stanu pluripotencjalności (*NANOG*, *OCTA*) w przypadku komórek hodowanych w 5% O₂, zarówno w stosunku do komórek kontrolnych (bez dodatku związków niskocząsteczkowych), jak i komórek z dodatkiem tego związku, ale hodowanych w 21% O₂,
 - nie zmienia w sposób znaczący ekspresji genów typowych dla różnicowania neuronalnego (*β-TUBULINY III*, *MAP2*),
 - istotnie zwiększa ekspresję *PDGFRα* w komórkach hodowanych w 5% O₂, zarówno w stosunku do komórek kontrolnych, jak i komórek z dodatkiem tego związku, ale hodowanych w 21% O₂,
 - istotnie zwiększa poziom ekspresji *SI00β* w komórkach z hodowli w 5% O₂ w porównaniu do komórek z 21% O₂,
 - nie zmienia istotnie ekspresji genów związanych z odpowiedzią na hipoksję (*HIF1α* i *HIF2α*),
 - nie zmienia ekspresji *HDAC1*, ale w znaczący sposób podwyższa ekspresję *HDAC2* w obu wariantach tlenowych,
 - w sposób znaczący obniża poziom ekspresji metylotransferaz DNA (*DNMT3A*, *DNMT3B*) w komórkach hodowanych w 5% i 21% O₂.

- dodatek TSA
 - powoduje istotne zwiększenie ekspresji *NANOG* i *OCTA* w komórkach hodowanych w 5% O₂ w stosunku do komórek kontrolnych i hodowanych 21% O₂ z dodatkiem TSA,
 - w żadnym z wariantów tlenowych nie zmienia ekspresji *β-TUBULINY III*,
 - powoduje wyraźny wzrost poziomu *MAP2* w komórkach hodowanych w 5% O₂ w stosunku do 21% O₂ z dodatkiem TSA,
 - znacznie zwiększa ekspresję *PDGFRα* w hodowli z 5% O₂ zarówno w stosunku do komórek kontrolnych, jak i komórek z dodatkiem tego związku, ale hodowanych w 21% O₂,
 - istotnie zwiększa poziom ekspresji *SI00β* w komórkach z hodowli w 5% O₂ w porównaniu do komórek z 21% O₂,
 - nie wpływa w sposób znaczący na ekspresję *HIF1α* i *HIF2α*,
 - powoduje wzrost ekspresji *HDAC1* w komórkach hodowanych w 5% O₂, zarówno w stosunku do komórek kontrolnych, jak i komórek z dodatkiem tego związku, ale hodowanych w 21% O₂,
 - w sposób znaczący podwyższa ekspresję *HDAC2* w obu stężeniach tlenu, jednakże w przypadku 5% O₂ zmiana ta jest istotnie większa,
 - zarówno w 5%, jak i 21% O₂ obniża ekspresję *DNMT3A* i *DNMT3B* w stosunku do komórek kontrolnych. Ponadto obserwuje się zdecydowanie niższy poziom ekspresji *DNMT3A* w komórkach hodowanych z dodatkiem TSA w 21% O₂ w stosunku do 5% O₂.

W tabeli 7 podsumowano wpływ badanych związków niskocząsteczkowych na zmiany w ekspresji genów z uwzględnieniem wpływu stężenia tlenu w hodowli. Pierwszy wiersz opisuje wpływ 21% stężenia tlenu w hodowli, drugi 5% O₂, w trzecim zaznaczono czy stężenie tlenu miało wpływ na odpowiedź komórek na badany związek (tak/nie). Zastosowano następujące oznaczenia:

- brak zmian
- ↑ istotne statystycznie zwiększenie ekspresji
- (↑) nieistotne statystycznie zwiększenie ekspresji
- ↓ istotne statystycznie zmniejszenie ekspresji
- (↓) nieistotne statystycznie zmniejszenie ekspresji

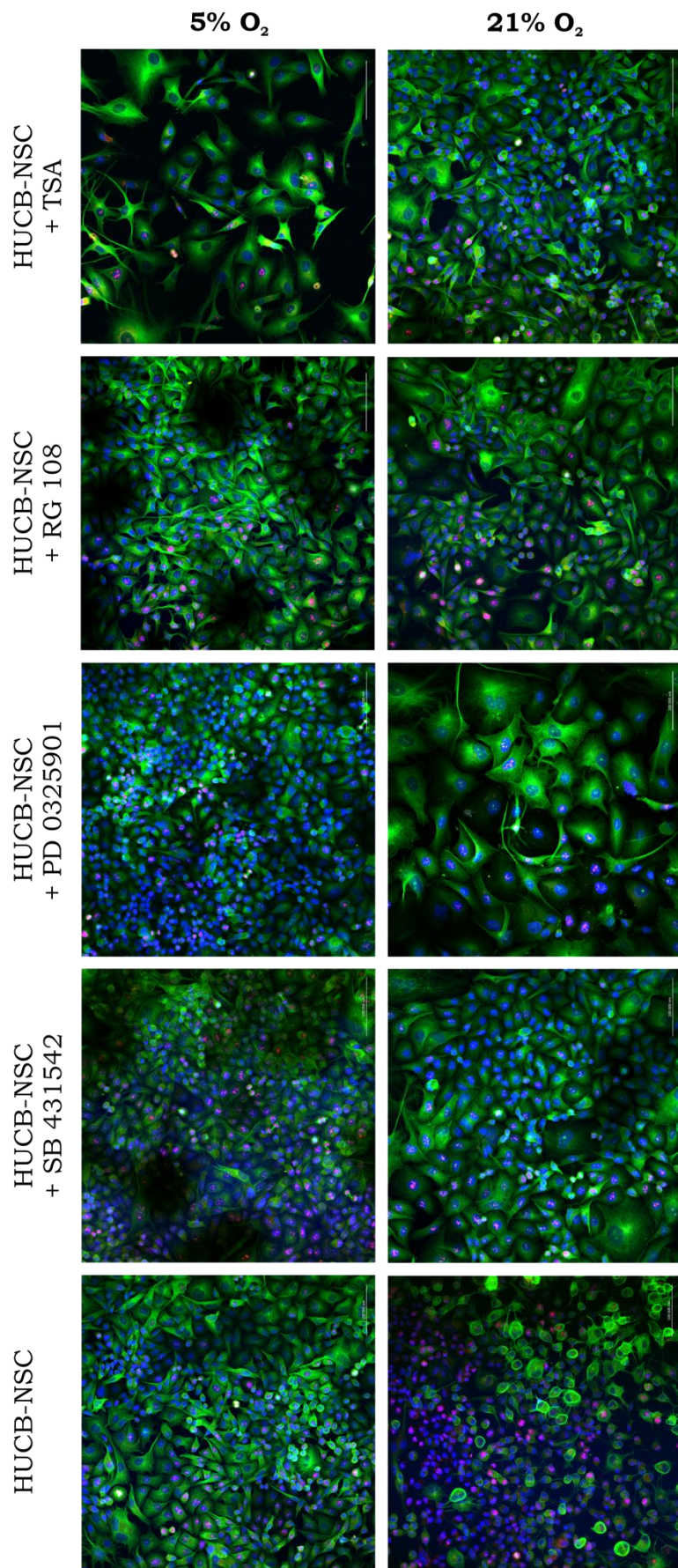
Tabela 7. Podsumowanie wpływu stężenia tlenu w hodowli i dodatku związków niskocząsteczkowych na ekspresję badanych genów w komórkach HUCB-NSC, hodowanych w 5 lub 21% O₂ z dodatkiem jednego z badanych związków (SB 431542, PD 0325901, RG 108, TSA). Tabela podsumowuje wyniki zaprezentowane na rycinie 17.

	<i>NANOG</i>	<i>OCT3/4 (A)</i>	<i>B-TUB III</i>	<i>MAP2</i>	<i>PDGFRα</i>	<i>S100β</i>	<i>HIF1α</i>	<i>HIF2α</i>	<i>HDAC1</i>	<i>HDAC2</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>DNMT3B</i>
SB 431542												
21% O ₂	-	-	↑	-	-	-	-	(↑)	-	↑	↓	↓
5% O ₂	-	-	-	-	-	-	(↑)	↑	-	↑	↓	↓
21 vs 5% O ₂	nie	nie	tak	nie	nie	nie	tak	tak	nie	nie	nie	nie
PD 0325901												
21% O ₂	-	-	↑	-	-	-	-	↑	-	-	↓	↓
5% O ₂	↑	-	-	-	↑	-	-	↑	-	↑	↓	↓
21 vs 5% O ₂	tak	nie	tak	nie	tak	nie	nie	nie	nie	tak	nie	nie
RG 108												
21% O ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	↓	↓
5% O ₂	↑	↑	-	-	↑	(↑)	-	-	-	↑	↓	↓
21 vs 5% O ₂	tak	tak	nie	nie	tak	tak	nie	nie	nie	tak	nie	nie
TSA												
21% O ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↑	↓	↓
5% O ₂	↑	↑	-	↑	↑	(↑)	-	-	↑	↑	↓	-
21 vs 5% O ₂	tak	tak	nie	tak	tak	tak	nie	nie	tak	tak	tak	tak

4.2.2. Ocena ekspresji białek typowych dla proliferacji i różnicowania

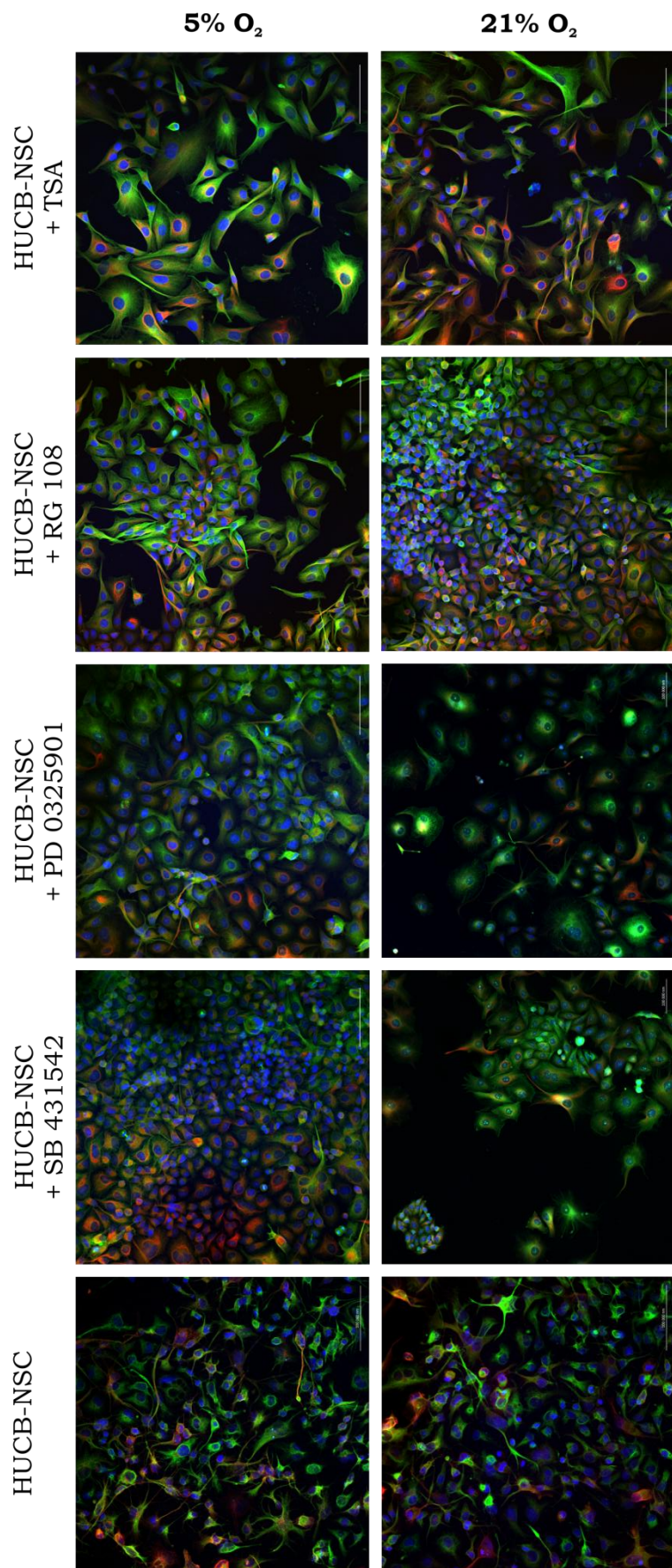
Ekspresję genów na poziomie białka oceniano metodą immunocytochemiczną. Sprawdzano obecność markerów związanych ze stanem pluripotencjalności (OCT4, SOX2), różnicowaniem neuralnym (β -TUBULINA III, NF200, MAP2, NG2, GalC, GFAP) oraz odpowiedzią na hipoksję (HIF1 α , HIF2 α). Uzyskane wyniki zestawione są na rycinach 18-23.

β -TUBULINA III / Ki67



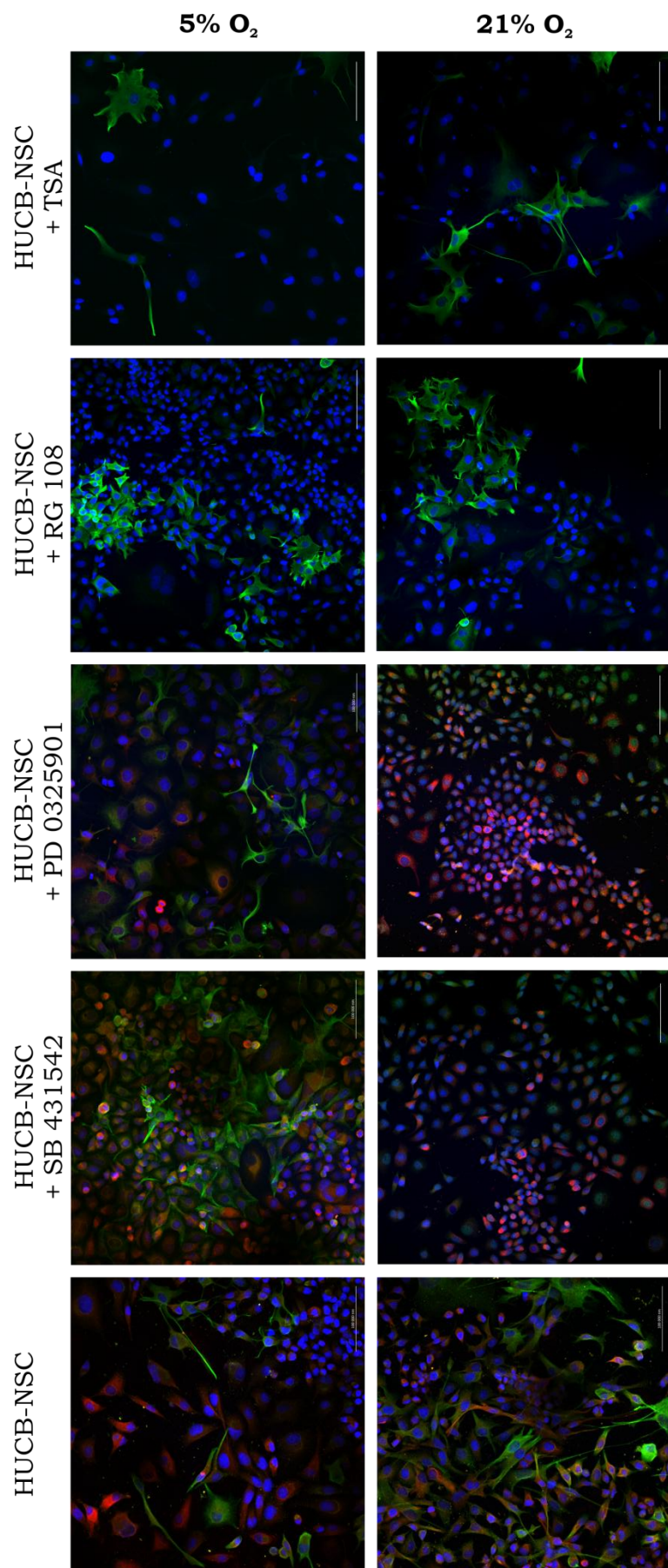
Rycina 18. Analiza immunocytochemiczna HUCB-NSC hodowanych w warunkach 5% i 21% stężenia tlenu w obecności lub bez dodatku badanych związków niskocząsteczkowych, sprawdzająca na poziomie białka ekspresję β -TUBULINY III (zielony) i Ki67 (czerwony). Jądra komórkowe barwione za pomocą Hoechst 33258 (niebieski). Skala 100 μ m.

β -TUBULINA III / NF200



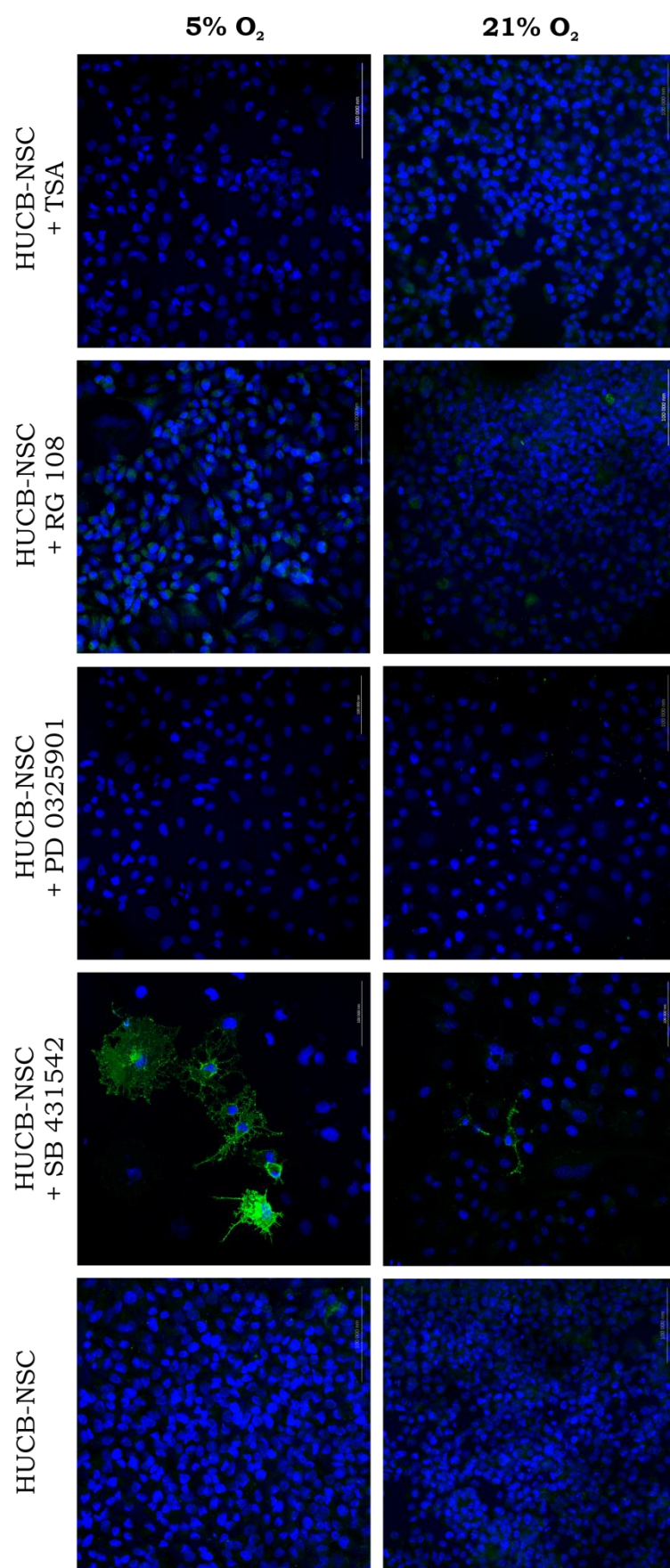
Rycina 19. Analiza immunocytochemiczna HUCB-NSC hodowanych w warunkach 5% i 21% stężenia tlenu w obecności lub bez dodatku badanych związków niskocząsteczkowych, sprawdzająca na poziomie białka ekspresję β -TUBULINY III (zielony) i NF200 (czerwony). Jądra komórkowe barwione za pomocą Hoechst 33258 (niebieski). Skala 100 μ m.

MAP 2 / GFAP

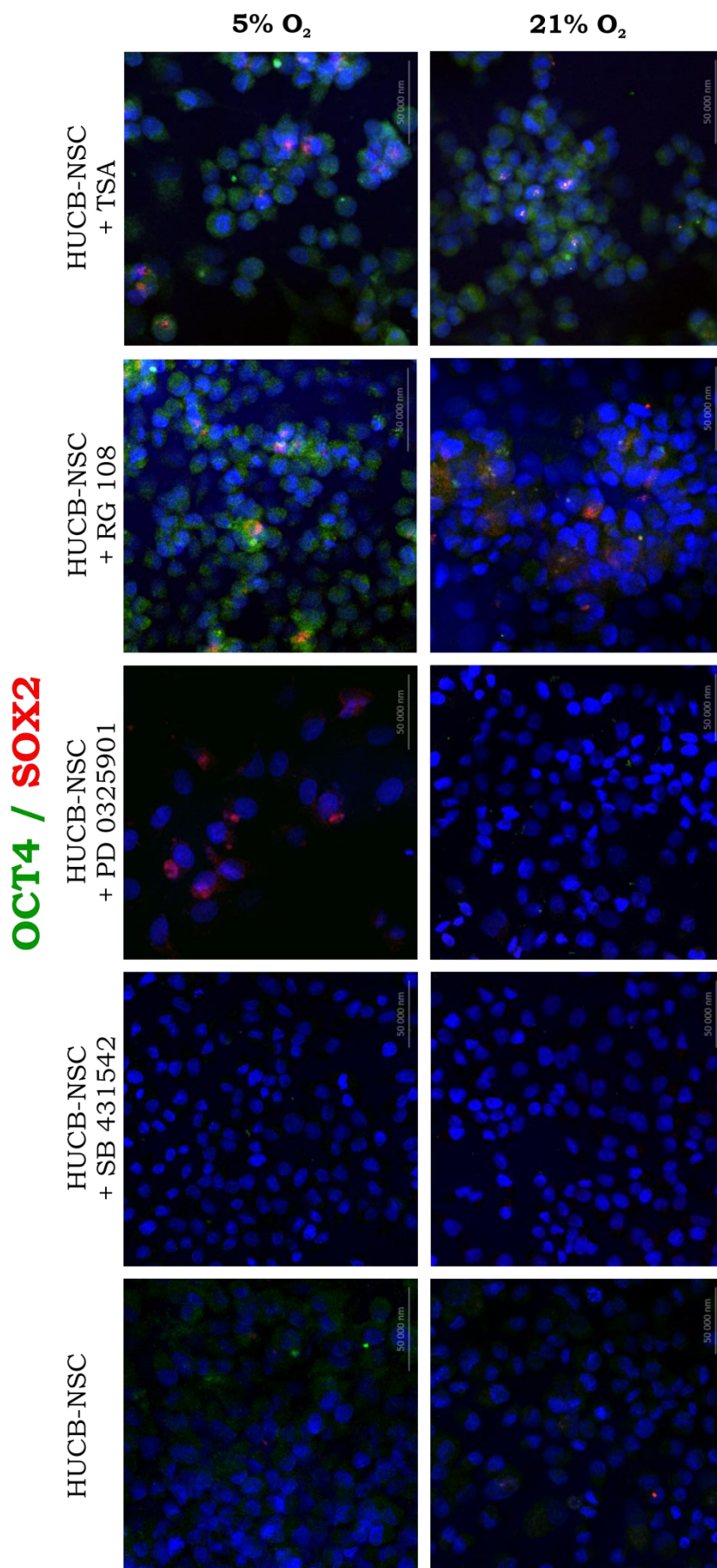


Rycina 20. Analiza immunocytochemiczna HUCB-NSC hodowanych w warunkach 5% i 21% stężenia tlenu w obecności lub bez dodatku badanych związków niskocząsteczkowych, sprawdzająca na poziomie białka ekspresję MAP2 (zielony) i GFAP (czerwony). Jądra komórkowe barwione za pomocą Hoechst 33258 (niebieski). Skala 100µm.

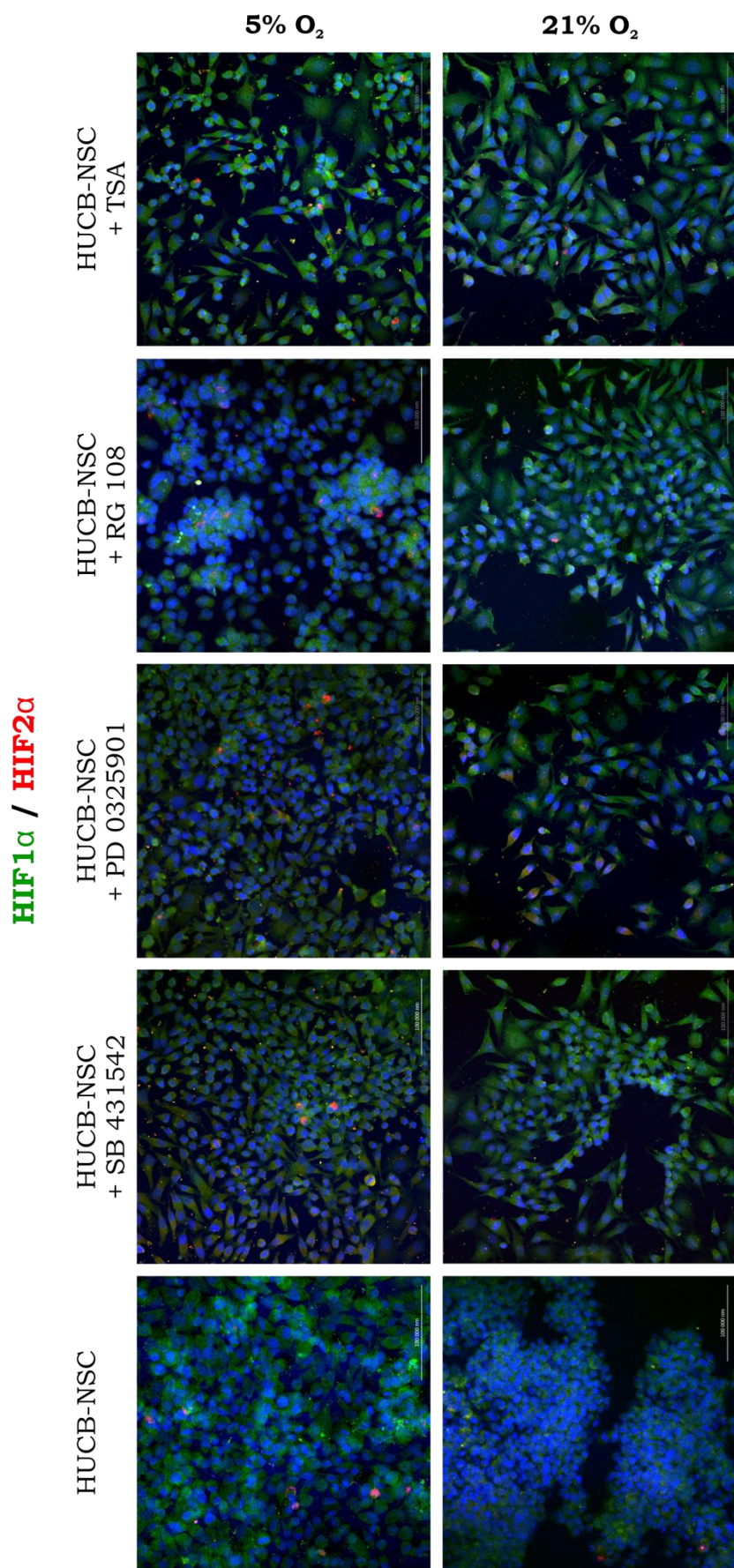
NG 2 / GalC



Rycina 21. Analiza immunocytochemiczna HUCB-NSC hodowanych w warunkach 5% i 21% stężenia tlenu w obecności lub bez dodatku badanych związków niskocząsteczkowych, sprawdzająca na poziomie białka ekspresję NG2 (zielony) i GalC (czerwony). Jądra komórkowe barwione za pomocą Hoechst 33258 (niebieski). Skala 100µm.



Rycina 22. Analiza immunocytochemiczna HUCB-NSC hodowanych w warunkach 5% i 21% stężenia tlenu w obecności lub bez dodatku badanych związków niskocząsteczkowych, sprawdzająca na poziomie białka ekspresję OCT4 (zielony) i SOX2 (czerwony). Jądra komórkowe barwione za pomocą Hoechst 33258 (niebieski). Skala 50µm.

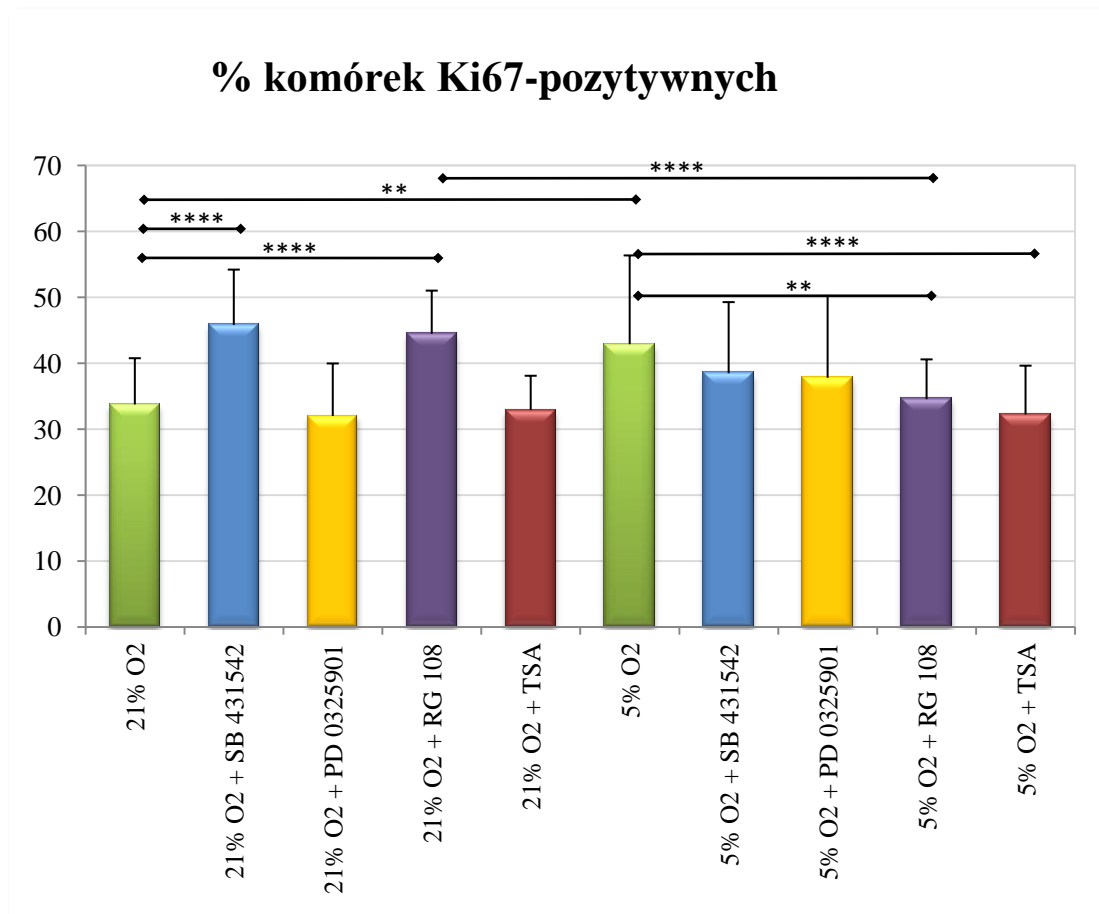


Rycina 23. Analiza immunocytochemiczna HUCB-NSC hodowanych w warunkach 5% i 21% stężenia tlenu w obecności lub bez dodatku badanych związków niskocząsteczkowych, sprawdzająca na poziomie białka ekspresję HIF 1 α (zielony) i HIF 2 α . (czerwony). Jądra komórkowe barwione za pomocą Hoechst 33258 (niebieski). Skala 100 μ m.

Analiza immunocytochemiczna pozwoliła stwierdzić, że:

- na poziomie białka obecna jest ekspresja markerów różnicowania neuronalnego (β -TUBULINA III, NF 200, MAP2) we wszystkich badanych wariantach, jednakże w komórkach rosnących w 21% O₂ z dodatkiem SB 431542 i PD 0325901 komórki wykazywały mniejszą ekspresję MAP2,
- marker oligodendrocytów - NG 2 pojawia się tylko w komórkach hodowanych z dodatkiem SB 431542 w obu testowanych wariantach tlenowych, przy czym więcej komórek NG 2-pozytywnych zaobserwowano w komórkach rosnących w 5% O₂,
- w żadnym z badanych wariantów nie zaobserwowano ekspresji GalC,
- ekspresja GFAP (marker astrocytów) występuje w komórkach kontrolnych oraz hodowanych z dodatkiem SB 431542 i PD 0325901 w obu wariantach tlenowych, nie zaobserwowano natomiast obecności komórek GFAP-pozytywnych w przypadku hodowli z dodatkiem RG 108 i TSA,
- markery typowe dla komórek pluripotencjalnych (OCT4 i SOX2) obecne są w komórkach hodowanych w 5% O₂ przy obecności trzech z testowanych związków niskocząsteczkowych: PD 0325901 - tylko SOX2; RG 108 i TSA - SOX2 i OCT4,
- ekspresja HIF1 α na poziomie białka była obecna w komórkach rosnących zarówno w 5%, jak i 21% O₂, we wszystkich badanych próbach eksperymentalnych, natomiast obecność HIF2 α zaobserwowano głównie w komórkach hodowanych w 5% O₂,
- we wszystkich badanych wariantach eksperymentalnych stwierdzono obecność komórek Ki67-pozytywnych, tj. zdolnych do proliferacji.

Kolejnym etapem oceny wpływu zastosowanych związków niskocząsteczkowych, była analiza ilościowa komórek Ki67-pozytywnych (Ryc. 24).



Rycina 24. Porównanie odsetka komórek zdolnych do proliferacji w populacjach progenitorów neuralnych hodowanych w różnych warunkach tlenowych z lub bez dodatku związków niskocząsteczkowych. Różnice były uznawane za istotne statystycznie, gdy wartość $p < 0,05$. Poziom istotności statystycznej: * - dla p mieszczącego się w przedziale $0,01 < p < 0,05$; ** - dla $0,001 < p < 0,01$; ***- dla $0,0001 < p < 0,001$, **** gdy $p < 0,0001$.

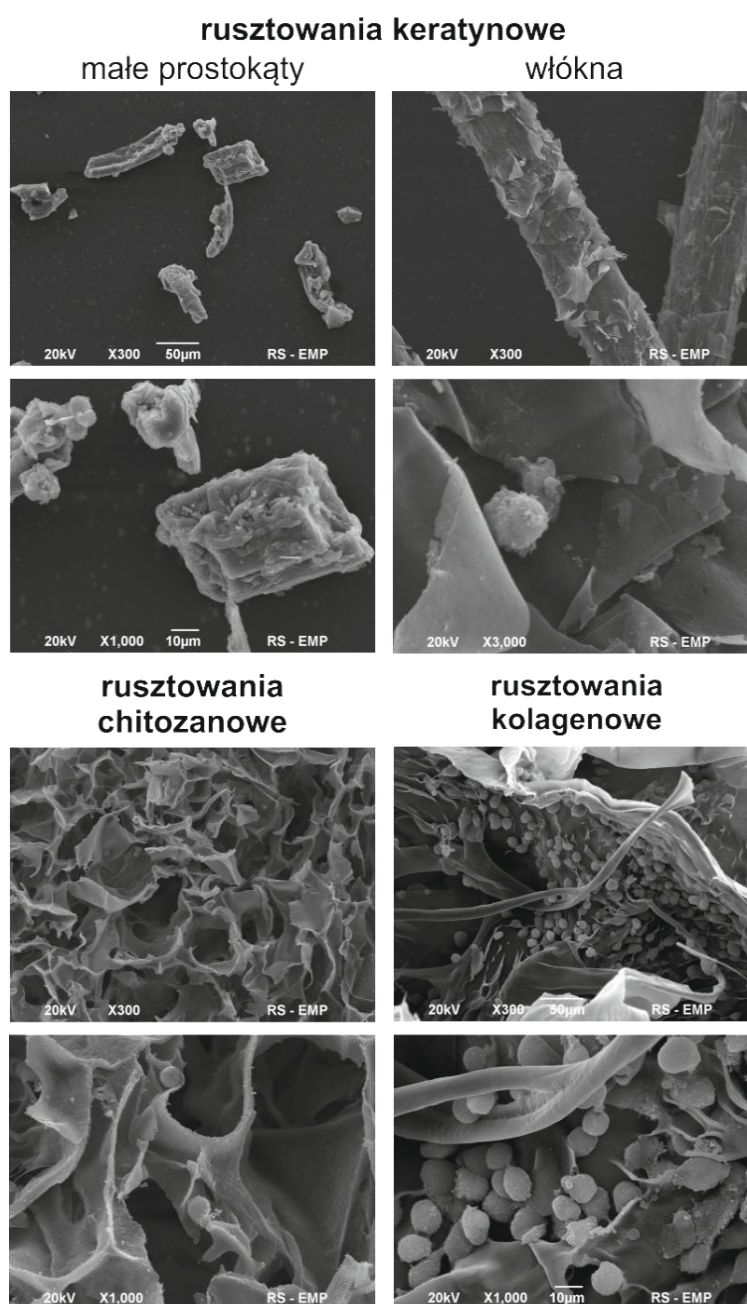
Po porównaniu procentowego udziału w badanej populacji komórek zdolnych do proliferacji stwierdzono, że dodatek związków niskocząsteczkowych zmienia potencjał proliferacyjny komórek. Wykazano, że:

- komórki kontrolne (bez dodatku związków niskocząsteczkowych) hodowane w 5% O₂ wykazują istotnie większy potencjał proliferacyjny niż komórki hodowane w 21% O₂;
- w przypadku komórek rosnących w 5% O₂ zaobserwowano spadek potencjału proliferacyjnego we wszystkich badanych wariantach doświadczalnych z dodatkiem związków niskocząsteczkowych, przy czym istotny statystycznie był spadek proliferacji w komórkach hodowanych z RG 108 i TSA,

- w przypadku komórek rosnących w 21% stężeniu tlenu zaobserwowano istotny wzrost liczby komórek Ki67-pozytywnych w wariantach eksperymentalnych z dodatkiem RG 108 i SB 431542,
- występuje istotna statystycznie różnica pomiędzy liczbą komórek zdolnych do proliferacji rosnących w 5% i 21% stężeniu tlenu z dodatkiem RG 108, przy czym stwierdzono więcej komórek Ki67-pozytywnych w wyższym stężeniu tlenu.

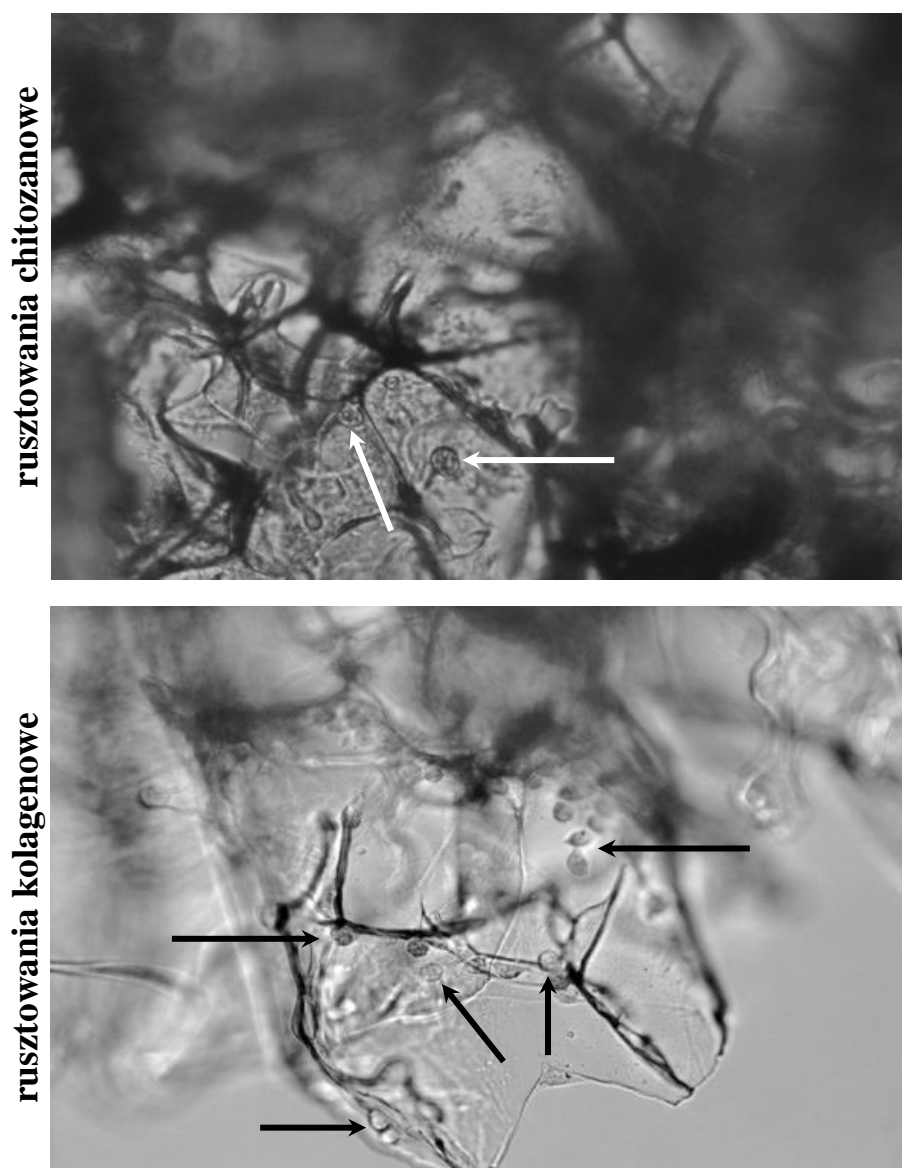
4.3. Badanie wpływu wybranych typów rusztowań 3D na proces różnicowania i zdolność do proliferacji komórek HUCB-NSC

Komórki w stadium rozwojowym progenitorów neuralnych (pożywka LS) były hodowane przez 5 dni w 5% i 21% stężeniu tlenu na wybranych rusztowaniach, następnie były utrwalane w celu wykonania zdjęć za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM), badań immunocytochemicznych oraz analizy ekspresji genów na poziomie mRNA.

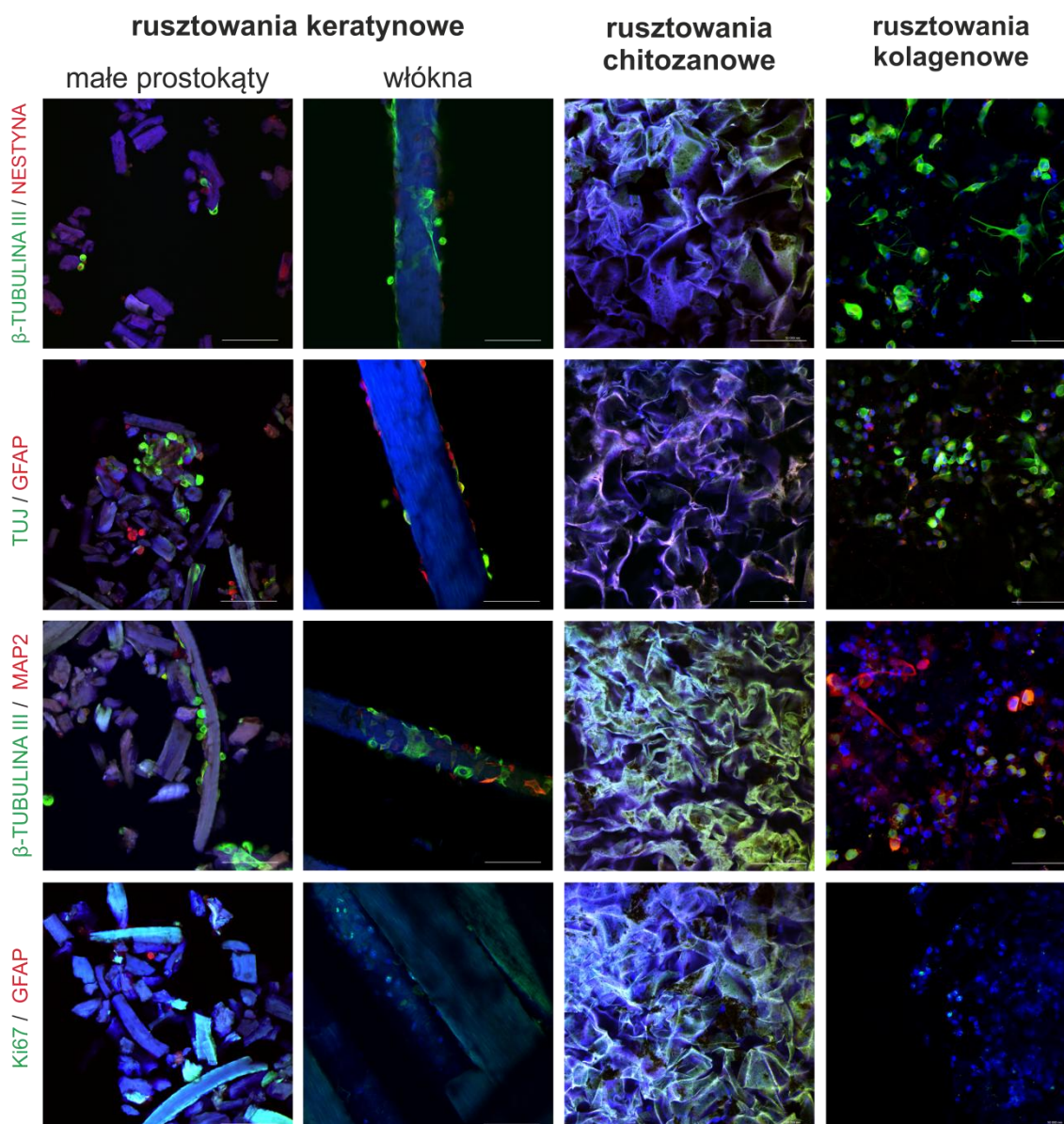


Rycina 25. Zdjęcia przedstawiające zasiedlenie badanych rusztowań przez komórki HUCB-NSC wykonane za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego.

Analiza zasiedlenia komórkami rusztowań przeprowadzona za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (Ryc. 25) wykazała większą skuteczność rusztowań kolagenowych w immobilizacji HUCB-NSC do powierzchni w porównaniu z rusztowaniami chitozanowymi i keratynowymi. Zdjęcia z mikroskopu świetlnego, wykonane przyżyciowo podczas hodowli (Ryc. 26) oraz fluorescencyjne z mikroskopu konfokalnego (Ryc. 27) wykazały, że komórki HUCB-NSC, choć w mniejszej liczbie, są obecne również na rusztowaniach chitozanowych i keratynowych.



Rycina 26. Zdjęcia przyżyciowe HUCB-NSC hodowanych na rusztowaniach chitozanowych i kolagenowych.



Rycina 27. Analiza immunocytochemiczna HUCB-NSC hodowanych na rusztowaniach trójwymiarowych, sprawdzająca na poziomie białka ekspresję β -TUBULINY III (zielony), NESTYNY (czerwony), MAP2 (czerwony), GFAP (czerwony) i Ki67 (zielony). Jądra komórkowe barwione za pomocą Hoechst 33258. Skala - 100 μ m.

Rycina 27 przedstawia panel zdjęć uzyskanych za pomocą mikroskopu konfokalnego. Zdjęcia obrazują komórki HUCB-NSC zasiedlające rusztowania trójwymiarowe, znakowane na obecność markerów różnicowania i proliferacji. Możemy na nich zaobserwować bardzo wysoki poziom autofluorescencji rusztowań wykonanych na bazie chitozanu, która uniemożliwiła właściwą analizę preparatów. Rusztowania na bazie keratyny wykazywały również autofluorescencję w szczególności w zakresie długości fali emitowanej 400-450nm, co pokrywa się z emisją barwnika

Hoechst 33258 używanego do wizualizacji jąder komórkowych. Rusztowania wykonane na bazie kolagenu wykazywały najmniejszą autofluorescencję.

Analiza immunocytochemiczna pozwoliła stwierdzić, że zarówno komórki hodowane na rusztowaniach wykonanych na bazie keratyny, jak i kolagenu wykazują ekspresję markerów typowych dla różnicowania neuronalnego (β -TUBULINĘ III i MAP2), jak również GFAP – związany z różnicowaniem astrocytarnym. Ponadto w obu przypadkach obserwowane są komórki Ki67-pozytywne, co świadczy o zachowaniu przez nie zdolności do proliferacji.

Kolejny etap analizy obejmował ocenę poziomu ekspresji genów różnicowania neuralnego na poziomie mRNA. Ze względu na niewielką liczbę komórek porastających rusztowania chitozanowe i keratynowe, a także na fakt, że materiały te dawały wysokie zanieczyszczenie uzyskiwanego mRNA, nie udało się uzyskać z nich materiału w odpowiedniej ilości i jakości do dalszych analiz. Ocena ekspresji genów metodą RT-PCR obejmowała materiał uzyskany z komórek rosnących na rusztowaniach wykonanych na bazie kolagenu w 5% lub 21% O₂. Uzyskane wyniki przedstawia tabela 8.

Tabela 8. Zestawienie wyników ekspresji genów (metoda RT-PCR) charakterystycznych dla stanu pluripotencjalności, różnicowania neuralnego, czynników indukowanych hipoksją i enzymów epigenetycznych w komórkach HUCB-NSC - wpływ hodowli na rusztowaniach kolagenowych i różnych warunków tlenowych.

	21% O ₂ Hodowla 2D	21% O ₂ Rusztowania kolagenowe	5% O ₂ Hodowla 2D	5% O ₂ Rusztowania kolagenowe
Geny charakterystyczne dla stanu pluripotencjalności				
<i>OCT 3/4 (A)</i>	-	-	-	-
<i>SOX2</i>	-	-	-	-
<i>NANOG</i>	-	-	-	-
Geny związane z różnicowaniem neuralnym				
<i>β-TUB III</i>	+	+	+	+
<i>MAP2</i>	+	+	+	-
<i>NF200</i>	+	+	+	+
<i>OLIG 1</i>	-	+	-	-
<i>OLIG 2</i>	-	+	-	-
<i>PDGFRα</i>	-	-	-	-
<i>GFAP</i>	-	-	-	-

	21% O ₂ Hodowla 2D	21% O ₂ Rusztowania kolagenowe	5% O ₂ Hodowla 2D	5% O ₂ Rusztowania kolagenowe
Czynniki Indukowane Hipoksją				
<i>HIF1α</i>	+	+	+	+
<i>HIF2α</i>	+	+	+	-
<i>HIF3α</i>	-	-	-	-
Geny związane z modyfikacjami epigenetycznymi				
<i>DNMT3A</i>	+	+	+	-
<i>DNMT3B</i>	+	+	+	+
<i>HDAC1</i>	+	+	+	+
<i>HDAC2</i>	+	+	+	+
<i>β-AKTYNA</i>	+	+	+	+

Analiza ekspresji badanych genów metodą RT-PCR wykazała, że:

- w komórkach HUCB-NSC hodowanych w układach 2D i 3D, w warunkach 5% i 21% stężenia tlenu nie występuje ekspresja genów charakterystycznych dla stanu pluripotencjalności (*OCT 3/4*, *SOX2*, *NANOG*),
- geny różnicowania neuronalnego: *β -TUBULINA III* i *NF200* podlegają ekspresji we wszystkich badanych wariantach eksperymentalnych, natomiast gen *MAP2* podlega ekspresji w komórkach HUCB-NSC hodowanych na rusztowaniach kolagenowych w warunkach 5% stężenia tlenu,
- w badanych próbach nie wykazano ekspresji *NESTYNY*, *GFAP* i genu kodującego receptora dla *PDGF*,
- ekspresję genów *OLIG1* i *OLIG2* (związane z różnicowaniem oligodendrocytarnym) zaobserwowano tylko w komórkach hodowanych na rusztowaniach kolagenowych w warunkach 21% stężenia tlenu.
- wszystkie badane próby wykazują ekspresję genu *HIF1 α* ,
- gen *HIF2 α* nie podlega ekspresji w komórkach HUCB-NSC hodowanych na rusztowaniach kolagenowych w warunkach 5% stężenia tlenu.
- w żadnym z badanych wariantów eksperymentalnych nie zaobserwowano ekspresji genu *HIF3 α* .
- metylotransferaza DNA (*DNMT3A*) nie jest ekspresjonowana przez komórki rosnące na rusztowaniach kolagenowych w 5% O₂,
- ekspresja *DNMT3B*, *HDAC1* i *HDAC2* jest obecna we wszystkich badanych wariantach doświadczalnych.

5. PODSUMOWANIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Podsumowanie badań z zastosowaniem 5% i 21% O₂ oraz inhibitora DMOG

- 5 % stężenie tlenu - typowe dla niszy komórek macierzystych (fizjologiczna normoksja) - pozytywnie wpływa na proces proliferacji HUCB-NSC w hodowli *in vitro* bez względu na etap rozwoju badanych komórek, a w stadium wczesnych progenitorów neuralnych (pożywka LS) jednocześnie promuje ich różnicowanie w kierunku neuronalnym;
- Obniżony poziom tlenu i DMOG działają synergistycznie na zwiększenie ekspresji genów HIF tylko w stadium progenitorów neuralnych (LS);
- Akumulacja czynników HIF, po synergistycznym działaniu obniżonego stężenia tlenu i DMOG, istotnie zwiększa ekspresję genów *NANOG* i *MAP2*, w sposób zależny od stadium rozwojowego komórek. Efekt ten jest obserwowany tylko w komórkach progenitorowych (pożywka LS);
- Poziom ekspresji genu *DNMT3B* zależy od stadium rozwojowego komórek - progenitory neuralne (LS) charakteryzują się wyższą ekspresją *DNMT3B*, niż komórki nieodróżnicowane (SF) w dwóch badanych wariantach tlenowych;
- Dodatek DMOG zwiększa ekspresję *DNMT3A*, *DNMT3B*, *HDAC1* i *HDAC2* tylko w przypadku progenitorów neuralnych w dwóch badanych stężeniach tlenu, przy czym efekt ten jest istotny statystycznie dla wszystkich ww. genów w komórkach hodowanych w 5% O₂;
- Analiza ilościowa wykazała pozytywną zależność pomiędzy ekspresją genów *DNMT3A*, *DNMT3B*, *HDAC1*, *HDAC2* oraz ekspresją genów związanych z hipoksją: *HIF1α* i *HIF2α* tylko dla progenitorów neuralnych (LS) hodowanych w 5% O₂ z DMOG. W tym wariantcie eksperymentalnym zaobserwowano zarówno wyraźne zwiększenie ekspresji genów HIF, jak i *DNMT3A*, *DNMT3B*, *HDAC1*, *HDAC2*.

Wnioski:

- Zaobserwowano zależną od stadium rozwojowego odpowiedź komórek HUCB-NSC na akumulację czynnika HIF, wynikającą z obniżenia stężenia tlenu w hodowli i zastosowania inhibitora DMOG.
- Obniżony poziom tlenu z dodatkową akumulacją czynnika HIF1 α (obecność inhibitora DMOG) pozytywnie wpływa na wszystkie badane procesy - proliferację prowadzącą do samoodnowy i różnicowanie HUCB-NSC, ale tylko w stadium progenitorów neuralnych.
- Populacja komórek w stadium rozwojowym progenitorów neuralnych, w warunkach obniżonego stężenia tlenu wykazuje cechy komórek macierzystych, zdolnych do proliferacji i różnicowania neuralnego, dlatego została uznana jako optymalna do dalszych badań z zastosowaniem związków niskocząsteczkowych i rusztowań 3D.

Podsumowanie badań z zastosowaniem 5% i 21% O₂ oraz związków niskocząsteczkowych

- Wykazano, że obniżenie stężenia tlenu w hodowli oraz dodatek PD 0325901, RG 108 i TSA zwiększają ekspresję genu *NANOG*. Ponadto, RG 108 i TSA wraz z 5% O₂ podwyższają dodatkowo ekspresję *OCTA*;
- SB 431542 i PD 0325901 zwiększają ekspresję β -*TUBULIN III* w komórkach hodowanych w warunkach 21% O₂;
- Ekspresja *MAP2* jest istotnie podwyższona w przypadku zastosowania inhibitora deacetylaz histonów - TSA w warunkach obniżonego stężenia tlenu;
- Zależnie od stężenia tlenu PD 0325901, RG 108 i TSA zmieniają ekspresję genu dla *PDGFR α* – w warunkach 5% O₂ ekspresja ta jest wyższa;
- Ekspresja *SI00 β* zwiększa się w warunkach obniżonego stężenia tlenu po dodaniu do hodowli komórkowej RG 108 i TSA;
- Tylko zastosowanie SB 431542 pozwoliło uzyskać populację komórek NG2-pozytywnych;

- Również, tylko w przypadku SB 431542 wykazano zależne od niskiego stężenia tlenu zwiększenie ekspresji czynników indukowanych hipoksją;
- SB 431542 w sposób niezależny od stężenia tlenu reguluje ekspresję enzymów związanych ze zmianami epigenetycznymi (*HDAC2*, *DNMAT3a*, *DNMAT3b*);
- Wpływ TSA na ekspresję *HDAC1*, *HDAC2*, *DNMAT3a* jest zależny od zastosowanego w hodowli komórkowej stężenia tlenu. Podwyższenie ekspresji wymienionych genów jest obserwowane w komórkach hodowanych w 5% O₂;
- Wszystkie zastosowane związki spowodowały zwiększenie ekspresji *HDAC2*, jednakże w komórkach hodowanych w 5% O₂ zmiana ta była istotnie większa;
- Badane związki wyraźnie zmniejszają ekspresję metylotransferaz DNA (*DNMT3A*, *DNMT3B*) w obu zastosowanych wariantach tlenowych;
- W populacji komórek kontrolnych (bez dodatku związków) 5% O₂ istotnie zwiększa proliferację komórek (wzrost o około 10%);
- Dodatek wszystkich badanych związków niskocząteczkowych wpływa na obniżenie zdolności proliferacyjnej komórek w 5% O₂ (RG 108 i TSA istotnie statystycznie), natomiast dodatek SB 431542 i RG 108 w 21% O₂ spowodował istotny wzrost liczby komórek Ki67-pozytywnych.

Wnioski:

- Różnice w ekspresji genów typowych dla stanu pluripotencjalności i różnicowania indukowane związkami niskocząteczkowymi były zależne od stężenia tlenu w hodowli;
- Zastosowane związki niskocząteczkowe zmieniają promujący wpływ obniżonego stężenia tlenu na zdolność komórek do proliferacji.
- Dzięki zastosowaniu kombinacji wybranych warunków tlenowych i jednego z badanych związków możemy uzyskać populację o określonych, pożądanym właściwościach, np.: 5% O₂ w połączeniu z SB 431542 pozwala uzyskać populację komórek NG2-pozytywnych, co świadczy o różnicowaniu oligodendrocytarnym, natomiast ekspozycja komórek na TSA w tych samych

warunkach tlenowych wyraźnie zwiększa ekspresję *MAP2*, świadcząc o pojawieniu się frakcji komórek różnicujących się neuronalnie.

- Dlatego też uważamy, że zastosowanie wybranych związków niskocząsteczkowych i regulowanego stężenia tlenu w hodowli może być metodą z wyboru do uzyskania populacji komórek kompetentnych terapeutycznie.

Podsumowanie badań w warunkach 3D

- Zarówno układ przestrzenny jak i skład biomateriału, z którego zbudowane są rusztowania, wpływają na proces przylegania, proliferacji i różnicowania komórek HUCB-NSC;
- Spośród badanych rusztowań tylko rusztowania kolagenowe zapewniają komórkom HUCB-NSC warunki, które umożliwiają ich przyleganie i przeżywanie, przy zachowaniu zdolności do proliferacji i wielokierunkowego różnicowania.

Wniosek:

Chemicznie modyfikowane rusztowania kolagenowe stanowią optymalne podłoże do hodowli komórek HUCB-NSC. Komórki obserwowane są na całej powierzchni 3D, rusztowania kolagenowe spełniają więc warunek biokompatybilności i mogą stanowić nośnik dla kompetentnych terapeutycznie komórek macierzystych w stadium rozwojowym wykazującym zdolność do proliferacji i wielokierunkowego różnicowania.

6. DYSKUSJA

Celem tej pracy było zbadanie, jakie warunki mikrośrodowiska *in vitro* będą stanowiły niszę biomimetyczną dla neuralnych komórek macierzystych. Takie warunki powinny zapewnić z jednej strony trójwymiarową strukturę logistyczną, a z drugiej skład fizykochemiczny przypominający środowisko naturalne, które indukują procesy komórkowe związane z rozwojem neuralnym. W tej pracy ustalono warunki prekondycjonowania *in vitro* neuralnych komórek macierzystych otrzymanych z krwi pępowinowej (HUCB-NSC), które umożliwiają ich proliferację i wielokierunkowe różnicowanie neuralne. Takie właściwości wydają się być wskazane dla komórek terapeutycznych w przypadku terapii komórkowej uszkodzeń OUN, kiedy potrzebne jest działanie rekonstrukcyjne: repopulacja miejsca uszkodzenia określonym typem komórek, dopasowanym do jednostki chorobowej, z możliwością włączenia ich w funkcjonalną strukturę tkanki nerwowej (Goldman, 2016). Obecnie stosowane terapie komórkowe OUN swoją skuteczność zawdzięczają głównie właściwościom adjuwacyjnym przeszczepianych mezenchymalnych KM, które działają przeciwzapalnie i neuroprotekcynie, natomiast brak jest dowodów, że mogą one spełniać funkcje rekonstrukcyjne (Laroni i wsp. 2015, Bianco i wsp. 2013). Przeszczepy allogeniczne neuralnych komórek macierzystych otrzymywanych z nisz endogennych OUN płodów po spontanicznych poronieniach są stosowane w próbach klinicznych (Mazzini i wsp. 2015), ale zarówno mała dostępność takich komórek, jak i towarzyszące im kontrowersje etyczne skłaniają do stosowania alternatywnych źródeł (np. z tkanek popłodu) otrzymywania neuralnych komórek macierzystych. W przypadku komórek macierzystych o pochodzeniu innym niż OUN, ich przyszłe powodzenie kliniczne może zależeć od prekondycjonowania w warunkach *in vitro* przypominających niszę endogenną. Dlatego też w niniejszej pracy badano, w jaki sposób określone czynniki niszy, wpływają na procesy rozwojowe HUCB-NSC w hodowli *in vitro*.

W prezentowanej rozprawie przedstawiono dwie hipotezy robocze.

Hipoteza pierwsza, w której założono zależność odpowiedzi komórkowej HUCB-NSC na obniżony poziom tlenu w hodowli od stadium rozwojowego, została zweryfikowana pozytywnie. Otrzymane wyniki wykazały, że poziom tlenu obniżony do

stężenia 5% (fizjologiczna normoksja) wpływa pozytywnie na proces proliferacji w sposób istotny statystycznie, ale tylko w stadium progenitorów neuralnych (pożywka LS). Co więcej, wykazano pozytywny efekt obniżonego poziomu tlenu na ekspresję genu *NANOG*, co sugeruje zdolność do samoodnowy proliferujących komórek. Efekt ten był charakterystyczny tylko dla wczesnych rozwojowo populacji komórek (SF i LS), ale nie dla komórek zróżnicowanych neuronalnie. W przypadku badania procesu różnicowania HUCB-NSC, obniżony poziom tlenu powodował odmienną odpowiedź w różnych stadiach rozwojowych: w komórkach niezróżnicowanych nie miał wpływu na ekspresję genu *MAP2*; w hodowli progenitorów neuralnych, w sposób synergistyczny z inhibitorem DMOG spowodował spektakularny (czterdziestokrotny) wzrost ekspresji *MAP2*; natomiast w hodowli komórek zróżnicowanych (LS + dBcAMP), w sposób istotny statystycznie, obniżył poziom ekspresji *MAP2*.

Powyższe wyniki pozwoliły wyłonić do dalszych badań populację progenitorów neuralnych (LS), które wykazywały największą wrażliwość na zmienne warunki stężenia tlenu w hodowli, w środowisku tlenu typowego dla niszy endogennej (5%), utrzymując zdolność rozwoju neuralnego.

Wyniki otrzymane w drugiej części pracy miały zweryfikować hipotezę drugą, która zakłada, że mikrośrodowisko *in vitro*, charakteryzujące się obniżonym poziomem tlenu, obecnością adherentnej struktury 3D oraz wybranych związków niskocząsteczkowych, umożliwia utrzymanie hodowli komórek NSC zdolnych jednocześnie do proliferacji, jak i wielokierunkowego różnicowania.

Przedstawione dane eksperymentalne weryfikują pozytywnie hipotezę drugą postawioną w tej rozprawie. Udowodniono, że w warunkach obniżonego stężenia tlenu (5%) wybrane związki niskocząsteczkowe umożliwiają różnicowanie HUCB-NSC we wszystkie trzy typy linii neuralnych oraz stymulują komórki do podziałów wraz z możliwością samoodnowy. Ponadto, hodowla komórek na trójwymiarowych rusztowaniach kolagenowych o charakterze gąbczastym stymuluje ekspresję markerów różnicowania neuralnego. Potwierdza to obecność w hodowli 3D na rusztowaniach kolagenowych markerów typowych dla komórek ukierunkowanych zarówno w komórki różnicujące się neuronalnie (β -TUBULINA III oraz *MAP2*) jak i glejowo (GFAP), a jednocześnie utrzymujących zdolność do proliferacji (Ki67). Dodatkowo komórki hodowane w 21% O₂ na poziomie mRNA wykazują ekspresję genów związanych z różnicowaniem w kierunku oligodendrocytów - *OLIG1* i *OLIG2*. Jednakże brak ekspresji białek typowych dla różnicowania oligodendroglialnego sugeruje, że

w hodowli biomimetycznej zapewniającej zrównoważony poziom różnicowania we wszystkie trzy linie neuralne, właściwe może być wspomaganie związkami niskocząsteczkowymi, które wpływają pozytywnie na różnicowanie glejowe (np. SB 431542). Te obserwacje wstępne wymagają dalszych badań w warunkach hodowli trójwymiarowej.

6.1. Wpływ warunków tlenowych w hodowli na kierunki rozwoju komórek znajdujących się na różnych etapach rozwoju: zależność od czynników indukowanych hipoksją

W ostatnich latach pojawiło się wiele ciekawych badań próbujących określić znaczenie składu gazowego (w tym tlenu) w hodowli komórkowej. Uwzględnia się w nich różne typy komórek pochodzące z wielu tkanek, w tym hodowle pierwotne i linie komórkowe, jak również komórki nowotworowe. Oceniany jest wpływ stężenia tlenu na proliferację, różnicowanie, reprogramowanie czy metabolizm komórki (Zhu i wsp. 2005, Ivanovicz, 2007, Pistollato i wsp. 2007, Eliasson i Jönsson 2010, Giese i wsp. 2010, Santilli i wsp. 2010, Szablowska-Gadomska i wsp. 2012, Drela i wsp. 2014, Zhao i wsp. 2014).

Dlatego też w naszym zespole prowadzone są badania mające na celu wyjaśnienie roli obniżonego stężenia tlenu (odpowiadającego fizjologicznej normoksji) na procesy rozwojowe komórek macierzystych. Wcześniejsze badania pozwoliły stwierdzić, że niskie (5%) stężenie tlenu ułatwia reprogramowanie komórek HUCB-NSC do indukowanych pluripotentjalnych komórek macierzystych (Szablowska-Gadomska i wsp. 2012).

W niniejszej pracy badano wpływ stężenia tlenu w hodowli komórkowej na różnicowanie i proliferację HUCB-NSC. Badania te obejmowały kilka doświadczeń, w których łączono zmienną, jaką jest stężenie tlenu (dwa warianty: hodowla w 5% i 21% O₂), z dodatkiem związków niskocząsteczkowych oddziałujących na komórkowe szlaki sygnałowe, lub rusztowaniami, które pozwalają stworzyć trójwymiarowe środowisko, w którym interakcje komórkowe są zbliżone do typowych dla niszy endogennej. Ponadto sprawdzano czy istnieje zależność pomiędzy stadium rozwojowym komórek, a ich odpowiedzią na zastosowane stężenie tlenu, czy jest to związane z ekspresją i akumulacją czynników indukowanych hipoksją. Sprawdzano

także, jak ekspresja tych czynników koreluje z ekspresją genów związanych z różnicowaniem w różne podtypy komórek neuralnych i czy ma to związek ze zmianami ekspresji genów kodujących enzymy odpowiedzialne za modyfikacje epigenetyczne.

Badania prowadzone w ostatnich latach, oceniające wpływ tlenu na komórki pozwoliły stwierdzić, że obniżenie poziomu tlenu promuje niezróżnicowany stan wielu populacji komórek macierzystych i progenitorowych (Okazaki i Maltepe 2006, Eliasson i Jönsson 2010, Szablowska-Gadomska i wsp. 2012, Huang i wsp. 2013, Drela i wsp. 2014, Lech i wsp. 2016).

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki porównujące poziom ekspresji genów potwierdzają, że 5% O₂ sprzyja utrzymaniu macierzystości w komórkach HUCB-NSC będących na etapie niezróżnicowanym i w progenitorach neuralnych, co przejawia się zwiększeniem ekspresji genu *NANOG*. Ponadto zaobserwowano, że w przypadku progenitorów neuralnych dodatek inhibitora hydroksylazy prolinowej - DMOG powodował istotne statystycznie wzmocnienie tego efektu - ekspresja *NANOG* zwiększyła się dwukrotnie w stosunku do progenitorów neuralnych hodowanych w 5% O₂ bez dodatku DMOG i około 12-krotnie w stosunku do komórek hodowanych z DMOG w 21% O₂. Można na tej podstawie wnioskować, że dla komórek będących w stadium progenitorów neuralnych akumulacja czynnika HIF1 α ma istotne znaczenie w utrzymaniu macierzystości. Co ciekawe, nie zaobserwowano podobnego efektu dla komórek niezróżnicowanych. Sugeruje to, że odpowiedź komórek na akumulację czynnika HIF1 α jest zależna od stadium rozwojowego.

Z danych literaturowych wynika, że podczas wczesnego etapu różnicowania ESC w kierunku neuronalnym ekspresja czynników transkrypcyjnych charakterystycznych dla stanu pluripotencjalności (jak OCT4, SOX2 czy *NANOG*) nie jest całkowicie zahamowana, a ich obecność spowalnia różnicowanie. Fakt, że hipoksja sprzyja ekspresji genów typowych dla stanu pluripotencji i ułatwia reprogramowanie komórek do iPSC (Forristal i wsp. 2010, Szablowska-Gadomska i wsp. 2012) częściowo wyjaśnienia, dlaczego może ona hamować proces różnicowania komórek będących na wczesnym etapie rozwoju. Z drugiej strony wykazano, że na późniejszych etapach różnicowania neuralnego, obniżone stężenie tlenu może regulować szlaki Wnt/ β -katenina i Notch, a także wpływać na sygnalizację związaną z OCT4, dzięki czemu sprzyja różnicowaniu i pozwala szybciej i wydajniej uzyskiwać NPC (Pistollato i wsp. 2007, De Filippis i Delia, 2011).

W naszych badaniach progenitory neuralne hodowane w pożywce z dodatkiem surowicy (LS) wykazują wyższą ekspresję genu *MAP2*, niż komórki hodowane w warunkach bezsurowicznych (SF), co jest zgodne z oczekiwanym, bardziej zróżnicowanym stadium rozwoju. W hodowlach kontrolnych (bez DMOG) nie obserwujemy różnic pomiędzy badanymi warunkami tlenowymi. Jednakże w przypadku progenitorów neuralnych obserwujemy silne działanie synergistyczne obniżenia poziomu stężenia tlenu i dodatku inhibitora hydroksylazy prolinowej – DMOG: wyraźne zwiększenie ekspresji *MAP2* tylko w komórkach hodowanych w warunkach 5% O₂. Przypuszczamy, że w tym przypadku do wzmocnienia procesu różnicowania niezbędna była kumulacja czynnika HIF1 α , spowodowana obniżeniem stężenia tlenu w hodowli i zablokowaniem jego degradacji dzięki DMOG.

Zastosowanie dBcAMP było narzędziem do otrzymania populacji komórek na trzecim badanym etapie rozwoju - różnicowanych neuronalnie. Różnicowanie neuronalne analizowane było jako zmiana ekspresji genu *MAP2*. Poziom ekspresji *MAP2* znacząco zwiększył się w hodowli z dBcAMP w porównaniu z komórkami bez dBcAMP, ale tylko w pożywce, w której była surowica (LS) i warunkach tlenu atmosferycznego. Natomiast obniżenie poziomu tlenu w populacji komórek zróżnicowanych (LS + dBcAMP) miało efekt hamujący na ekspresję *MAP2*. W komórkach niezróżnicowanych (pożywka SF) zmiana poziomu stężenia tlenu w hodowli nie wpłynęła na różnicowanie neuralne (ekspresja *MAP2* na tym samym poziomie). Ponadto, w tym wariancie doświadczalnym dodatek DMOG również nie wpływał na różnicowanie komórek HUCB-NSC. Przytoczone wyniki świadczą o tym, że efekt jaki na HUCB-NSC ma obniżone stężenie tlenu zależy od stadium rozwojowego komórek.

Z dostępnej literatury wynika, że stężenie tlenu w granicach 2,5-5% hamuje różnicowanie w kierunku astrocytarnym i sprzyja różnicowaniu komórek w kierunku neuronalnym *in vitro* (De Filippis i Delia 2011; Storch i wsp. 2001; Studer i wsp. 2000). Wyniki uzyskane przez Studer'a i współpracowników pokazują, że obniżenie stężenia tlenu w hodowli do około 2-3% (z 20%) sprzyjało proliferacji i hamowało apoptozę szurzych komórek progenitorowych śródmózgowia (ang. *rat Mesencephalic Precursor Cells*, rMPC). Ponadto, gdy ukierunkowano neuronalne różnicowanie tych komórek poprzez zastosowanie specyficznych neurotransmitterów, w hodowli z 2-3% O₂ uzyskano znacznie więcej neuronów dopaminergicznych (około 56%), w stosunku do hodowli w 20% O₂ (około 18%). Stwierdzono również, że różnicowanie to

zachodziło szybciej w obniżonym stężeniu tlenu (Studer i wsp. 2000). Nasze obserwacje potwierdzają indukcję różnicowania w kierunku neuronalnym przez obniżony poziom tlenu, ale tylko w stadium rozwoju progenitorów neuralnych i przy dodatkowej akumulacji czynnika HIF1 α za pomocą DMOG. Natomiast, po zastosowaniu dBcAMP, który indukuje neuronalne różnicowanie HUCB-NSC (pożywka LS+dBcAMP), zaobserwowano istotny spadek ekspresji MAP2 w komórkach hodowanych w 5% O₂, co sugeruje że obniżenie stężenie tlenu spowolniło różnicowanie neuronalne.

Badania przeprowadzone na neuralnych komórkach macierzystych wyizolowanych z nowonarodzonych myszy (mNSC) wykazały, że 5% stężenie tlenu, podobnie jak we wcześniejszych badaniach, sprzyjało proliferacji i różnicowaniu w kierunku neuronalnym (zwiększenie ilości komórek DCX i MAP2-pozytywnych), ale też wpływało na gliogenezę – komórki GFAP-pozytywne miały bardziej włóknisty fenotyp, dłuższe wypustki i w opinii autorów bardziej przypominały astrocyty występujące *in vivo*. Ponadto, w badaniach tych zaobserwowano znaczny wzrost liczby NG2-pozytywnych prekursorów oligodendrocytów (Sun i wsp. 2015). W naszych badaniach nie zaobserwowano wpływu obniżonego poziomu tlenu na różnicowanie glejowe w żadnym z badanych stadiów rozwojowych.

Binh i współpracownicy badali wpływ 5% O₂ na różnicowanie komórek będących na dwóch etapach rozwoju. Początkowo oceniano, jak niskie stężenie tlenu oddziałuje na mysie ESC i ich przekształcanie do NSC, a następnie czy ma znaczenie podczas różnicowania NSC do progenitorów neuralnych. Udowodniono, że w początkowym etapie rozwoju 5% O₂ hamuje przechodzenie mESC do NSC. Powstaje mniej NSC, co więcej, mają słabo zróżnicowany fenotyp neuralny (niższa ekspresja *Nestyny*, mniejsza liczba komórek TUJ1-pozytywnych, z krótszymi i mniej licznymi wypustkami). Natomiast podczas różnicowania NSC do NPC 5% stężenie tlenu sprzyjało różnicowaniu – pojawiło się więcej komórek MAP2 i GFAP pozytywnych, również na poziomie mRNA wykazano wyższą ekspresję tych genów (Binh i wsp. 2014). Badania te wykazały, że odpowiedź komórek na obniżone stężenie tlenu w hodowli jest zależna od etapu ich rozwoju, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy.

W naszych badaniach nie zaobserwowaliśmy istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji genów *HIF1 α* i *HIF2 α* w komórkach hodowanych w różnych

stężeniach tlenu, ale co ciekawe, istnieją pewne różnice w ich ekspresji wynikające ze stadium rozwojowego. Komórki niezróżnicowane charakteryzuje wyższa ekspresja *HIF1α* niż progenitory neuralne, przy czym różnica ta jest bardziej wyraźna w 21% O₂. Natomiast progenitory neuralne wykazują nieznacznie wyższą ekspresję *HIF 2α*.

W badaniach grupy Rona McKay'a (Studer i wsp. 2000), pomimo wyraźnego wpływu stężenia tlenu na proces różnicowania, nie zaobserwowano różnic w poziomie ekspresji genu *Hif1α* w komórkach rMPC hodowanych w 2-3% i 20% stężeniu tlenu (Studer i wsp. 2000), co jest zgodne z uzyskanymi w niniejszej pracy wynikami. Natomiast z badań przeprowadzonych przez Binh'a wynika, że mNSC hodowane w 5 i 20% O₂ wykazują wyraźne różnice w ekspresji genu *Hif1α*. Stwierdzono, że komórki hodowane w niższym stężeniu tlenu mają zdecydowanie większą ekspresję czynnika indukowanego hipoksją, co jest najlepiej widoczne w 8 dniu hodowli (Binh i wsp. 2014). Należy jednak zwrócić uwagę, że powyższe badania były prowadzone na komórkach macierzystych gryzoni, co może tłumaczyć różnice w stosunku do wyników otrzymanych na ludzkich komórkach NSC.

Z dostępnej literatury wynika, że obniżenie stężenia tlenu w hodowli hESC powoduje przejściowe (trwające około 48 godzin) zwiększenie ekspresji *HIF1α*. Po tym czasie nie obserwowano różnic w ekspresji tego czynnika w hodowli w 5 i 21% O₂ (Forristal i wsp. 2010). Obserwacja ta koreluje z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy – brak różnic w ekspresji *HIF1α* był prawdopodobnie spowodowany faktem, iż doświadczenia trwały dłużej niż 48 godzin, a komórki były przed eksperymentami prekondycjonowane przez 14 dni.

Przeprowadzone przez autorkę rozprawy badania pozwoliły stwierdzić, że dodatek inhibitora hydroksylazy prolinowej - DMOG powoduje znaczne zwiększenie ekspresji czynników indukowanych hipoksją (*HIF1α* i *HIF2α*) w komórkach HUCB-NSC oraz, że 5% O₂ dodatkowo zwiększa ten efekt, ale tylko w przypadku progenitorów neuralnych. Interesującym jest, że komórki niezróżnicowane, hodowane w pożywce bez surowicy (SF) nie wykazywały zmian w ekspresji *HIF1α* i *HIF2α* wywołanych różnym stężeniem O₂ w hodowli, a dodatek DMOG powodował nieznaczny spadek ekspresji tych genów (odwrotna tendencja niż w progenitorach neuralnych). Pozwala to stwierdzić, że komórki będące na różnych etapach rozwoju odmiennie reagują na akumulację czynnika HIF1α.

Bardzo ciekawe badania wykonane przez Petruzzelli'ego i współpracowników wykazały, że HIF2α reguluje ekspresję genu *NANOG* w ludzkich ESC poprzez wiązanie

się z elementem *cis*-regulatorowym oct-sox. Wykazali oni, że w promotorach genów kodujących czynniki transkrypcyjne OCT4, SOX2 i NANOG znajdują się miejsca HRE, do których w warunkach 5% O₂ wiążą się czynniki HIF, pośrednio powodując szereg zmian epigenetycznych i dzięki temu wpływając na regulację transkrypcji tych genów (Petruzzelli i wsp. 2014). Uzyskane w tej pracy wyniki dla progenitorów neuralnych hodowanych w 5% O₂ z dodatkiem DMOG są zgodne z powyższym odkryciem – zaobserwowano w nich zdecydowanie podwyższoną ekspresję *HIF2α* i genu *NANOG*.

Zhao i jego współpracownicy uważają, że HIF1 α jest kluczowym regulatorem, niezbędnym do różnicowania mESC w kierunku neuralnym. Odkryli, że indukowana hipoksją ekspresja *Hif1α* jest skorelowana ze zwiększeniem ekspresji *Sox1* – genu typowego dla progenitorów neuralnych i że to właśnie czynnik transkrypcyjny HIF1 α może bezpośrednio aktywować ekspresję *Sox1*. Ponadto stwierdzili, że zmniejszenie ilości HIF1 α skutkuje większą aktywnością *BMP4*, który uważany jest za inhibitor różnicowania neuralnego. Uzyskane przez nich wyniki mogą świadczyć o tym, że HIF1 α jest niezbędny do różnicowania mESC ze stadium rozwoju odpowiadającego epiblastowi do neuroektodermy (Zhao i wsp. 2014).

Czynniki HIF mogą promować lub hamować różnicowanie różnych typów komórek, m.in. przez ich oddziaływanie ze szlakiem sygnałowym Notch. Odkryto, że HIF1 α może bezpośrednio oddziaływać na receptor i pobudzać szlak sygnałowy Notch na drodze niekanonicznej (Mukherjee i wsp. 2011). Wykazano również, że dzięki stabilizacji wewnątrzkomórkowej domeny receptora Notch - NICD (ang. *Notch Intracellular Domain*, NICD), HIF1 α wpływa na podtrzymanie nieodróżnicowanego stanu NSC (Gustafsson i wsp. 2005). Fakt, że hipoksja może bezpośrednio pobudzać aktywność Notch jest niezwykle istotny, gdyż jest on zaangażowany w rozwój mózgu, reguluje przeżycie, proliferację i różnicowanie NSC, a także wpływa na plastyczność synaptyczną (Liu i wsp. 2010). Dlatego też uważam, że w przeprowadzonych doświadczeniach zwiększona ekspresja czynnika *HIF1α* mogła wpływać na różnicowanie neuronalne HUCB-NSC.

6.1.1. Wpływ stężenia tlenu w hodowli na proliferację

Ocena wpływu stężenia tlenu na proliferację HUCB-NSC pozwoliła stwierdzić, że 5% O₂ zwiększa populację komórek zdolnych do proliferacji (o około 10%) oraz, że w przypadku progenitorów neuralnych (pożywka LS) jest to zmiana istotna

statystycznie, natomiast w komórkach ukierunkowanych neuronalnie (pożywka LS + dBcAMP) jest to wyraźna tendencja.

Badania nad wpływem stężenia tlenu na procesy komórkowe ESC wykazały, że obniżenie jego stężenia poniżej 1% powoduje znaczny spadek proliferacji przy zachowaniu pluripotencji (Ezashi i wsp. 2005). Z drugiej strony badania z wykorzystaniem szczurzych NPC hodowanych w 20%, 10% i 3% stężeniu tlenu wykazały, że najwyższy indeks proliferacyjny wykazują komórki hodowane w 10% O₂ (Zhao i wsp. 2008). Co ciekawe, w badaniach przeprowadzonych przez Binh'a i współpracowników komórki NSC różnicowane do NPC w warunkach 5% O₂ wykazywały niższy potencjał proliferacyjny, niż analogiczne komórki hodowane w 21% O₂ (Binh i wsp. 2014). Natomiast z badań przeprowadzonych na szczurzych komórkach progenitorowych śródmózgowia, które podobnie jak w niniejszej pracy były różnicowane w kierunku neuronalnym wynika, że obniżenie stężenia tlenu (2-3%) sprzyjało proliferacji, co było wyraźnie widoczne w populacji na wczesnym etapie różnicowania (wczesne progenitory wykazujące ekspresję NESTYNY) i zachowane, aczkolwiek w mniejszym stopniu, w komórkach zróżnicowanych (Studer i wsp. 2000). Wyniki uzyskane w niniejszej pracy korespondują z tymi uzyskanymi przez zespół Studer'a.

Przytoczone wyżej badania jednoznacznie wskazują, że obniżenie stężenia tlenu w hodowli zwiększa zdolność komórek macierzystych do proliferacji. Jednakże jego zbyt niski poziom hamuje podziały komórkowe. Można by przypuszczać, że utrzymanie w hodowli stężenia tlenu zbliżonego do tego, jaki występuje w niszy (w przypadku komórek neuralnych nawet poniżej 1%), będzie prowadziło do utrzymania puli komórek nie zróżnicowanych, wolno proliferujących, które będą w stanie uśpienia. Nieznaczne podniesienie stężenia tlenu, do wartości ~ 5% spowoduje, że komórki te, choć nadal nie zróżnicowane, charakteryzować się będą szybszymi podziałami. Można by to porównać z komórkami, które w niszy NSC po podziale asymetrycznym i wyjściu z fazy uśpienia, rozpoczynają proces namnażania i powolnego różnicowania (wczesne progenitory). Natomiast komórki o charakterze późnych progenitorów, które opuszczają niszę i migrują do różnych obszarów mózgu są wystawione na działanie wyższych stężeń tlenu (>5%), dlatego też ich potencjał do proliferacji nie wzrasta tak wyraźnie w 5% O₂. Zdaniem autorki zdolność komórek HUCB-NSC do proliferacji w obniżonych warunkach stężenia tlenu (5%) zależy od stadium rozwojowego, w którym się znajdują.

Dodatkowe informacje pozwalające wnioskować o mechanizmach molekularnych zaangażowanych w regulację proliferacji NSC w różnych warunkach stężenia tlenu wynikają z prac Huang'a i współpracowników (2013), którzy badali w NSC białko NECDIN, obecne w postmitotycznych neuronach i posiadające właściwości antymitotyczne i antyapoptotyczne. W swoich badaniach wykazali, że hipoksja, poprzez czynniki HIF, indukuje degradację białka NECDIN, co z kolei powodowało zwiększenie ilości proliferujących komórek. Dalsze badania pozwoliły stwierdzić, że w izolowanych z myszy NSC obecna była nadekspresja czynnika *Hif2α*, który poprzez swoją domenę PAS wchodził w interakcję z białkiem NECDIN, co skutkowało jego ubikwitynacją i degradacją w proteasomach (podobnie jak ma to miejsce w przypadku czynników HIF w warunkach atmosferycznego stężenia tlenu) (Huang i wsp. 2013). Wyniki te wskazują, jaki jest jeden z mechanizmów wpływu obniżonego stężenia tlenu na proliferację NSC.

Odnosząc uzyskane w niniejszej pracy wyniki do wyżej przytoczonych teorii o mechanizmach regulacji proliferacji komórek neuralnych będących na różnych etapach zróżnicowania można przypuszczać, że zwiększenie proliferacji w komórkach hodowanych w pożywce z niskim stężeniem surowicy (LS) i 5% O₂, związane było z ekspresją genu *NANOG*. Wydaje się jednak, że w komórkach różnicowanych w kierunku neuronalnym (LS + dBcAMP) zwiększenie liczby komórek proliferujących przez 5% O₂ mogło być związane z odblokowaniem mechanizmu związanego z białkiem NECDIN.

6.2. Wpływ związków niskocząsteczkowych na różnicowanie i proliferację HUCB-NSC

Istnieje wiele badań potwierdzających, że za pomocą związków chemicznych możemy regulować zdolność do samoodnowy, proliferację, różnicowanie lub odróżnicowywanie komórek, a także ich transdyferencjację. Związki niskocząsteczkowe są więc wszechstronnymi narzędziami umożliwiającymi stosunkowo łatwą i wygodną metodę zmiany/ukierunkowania losu komórek (Ebrahimi 2016). Są również stosowane jako czynniki wspomagające przy otrzymywaniu indukowanych komórek macierzystych (Biswas i Jiang 2016).

W niniejszej pracy testowano cztery związki wpływające na szlaki przekazywania sygnału (SB 431542, PD 0325901) lub enzymy odpowiedzialne za modyfikacje epigenetyczne (RG 108, TSA).

SB 431542 jest wydajnym i specyficznym inhibitorem receptorów ALK4, 5 i 7, który nie wpływa na zahamowanie ścieżki sygnałowej BMP (działającej przez ALK1-3 i 6) (Inman i wsp. 2002). ALK4, 5 i 7 to receptory dla TGF β , które wykazują aktywność kinazy serynowo-treoninowej i po aktywacji ligandem fosforylują białka SMAD, które po dotarciu do jądra komórkowego indukują ekspresję wielu genów odpowiedzialnych m.in. za wzrost, różnicowanie, procesy chemotaksji i migrację komórek, a także formowanie i degradację składników ECM oraz apoptozę (Stępień-Wyrobiec i wsp. 2008).

Dwa spośród stosowanych związków PD 0325901 i SB 431542, wraz z kilkoma innymi związkami niskocząsteczkowymi były z powodzeniem stosowane do reprogramowania mysich fibroblastów do iPSC (Park i wsp. 2015). Ponadto wykazano, że SB 431542 w innej kombinacji (z inhibitorem GSK3 β) może powodować konwersję ludzkich fibroblastów do funkcjonalnych komórek przypominających neurony (Ladewig i wsp. 2012). W prezentowanej pracy nie wykazano wpływu SB 431542 na ekspresję genów typowych dla stanu pluripotencjalności, co nie jest zgodne z wynikami uzyskanymi przez Park'a.

Stwierdzono zwiększenie potencjału do proliferacji komórek hodowanych w 21% O₂ z dodatkiem SB 431542, ale - co ciekawe - efekt ten nie był obserwowany w warunkach obniżonego stężenia tlenu. Z dostępnej literatury wynika, że SB 431542 może być potencjalnym lekiem zmniejszającym proliferację i migrację ludzkich komórek glejaka (Hjelmeland i wsp. 2004). Wewnątrz guza dostępność tlenu jest niższa i być może jest to czynnik niezbędny do uzyskania przeciwnowotworowego działania SB 431542. Tendencja do zmniejszonej proliferacji HUCB-NSC hodowanych w 5% O₂ z SB 431542 jest więc zgodna z ograniczeniem proliferacji komórek glejaka pod wpływem tego związku.

Równocześnie ze zwiększonym potencjałem do proliferacji komórek hodowanych w warunkach 21% O₂ z dodatkiem SB 431542 zaobserwowano podwyższenie ekspresji *β -TUBULINY III*. Sugeruje to, że SB 431542 sprzyja początkowej fazie różnicowania NSC w kierunku neuronalnym, ale tylko w warunkach tlenu atmosferycznego. W stosunku do hodowli kontrolnej stwierdzono nieznaczny

spadek ilości mRNA dla *MAP2* i niewielki wzrost ekspresji *S100β*. Dodatek SB 431542, jako jedyny spowodował pojawienie się frakcji komórek NG2-pozytywnych zarówno w 5%, jak i 21% O₂, z tym że w obniżonym stężeniu tlenu komórek tych było więcej, co świadczy o stymulacji różnicowania glejowego przez SB 431542.

Również tylko w przypadku SB 431542 wykazano zależny od tlenu wpływ na ekspresję *HIF1α*, którego ekspresja w stosunku do komórek kontrolnych była mniejsza w warunkach tlenu atmosferycznego i większa w 5% O₂. Na tej podstawie możemy przypuszczać, że SB 431542 w sposób zależny od *HIF1α* wpływa na początkowy etap różnicowania HUCB-NSC. W warunkach 21% O₂, przy małej ilości *HIF1α* promując utrzymanie populacji proliferujących komórek ukierunkowanych neuronalnie, natomiast przy wyższym stężeniu *HIF1α* zwiększając populację progenitorów ukierunkowanych oligodendrocytarnie. Ponadto stwierdzono, że SB 431542 znacznie zmniejszył ekspresję *DNMT3A* i *DNMT3B* w obu wariantach tlenowych i zwiększył ekspresję *HDAC2*.

W swoich badaniach Wu (2012) wykazał, że NSC pozbawione *DNMT3A* (*Dnmt3a*^{-/-} NSC) charakteryzują się globalną hipometylacją DNA i zwiększoną proliferacją, przy równocześnie zaburzonym różnicowaniu. Komórki pozbawione *DNMT3A* będące we wczesnych pasażach (p3) miały tendencję do przedwczesnego różnicowania w kierunku glejowym, co skutkowało zwiększoną frakcją oligodendrocytów i astrocytów w hodowli, przy równoczesnym braku zaburzeń w różnicowaniu neuronalnym (Wu i wsp. 2012). Spośród badanych przez autorkę związków to właśnie SB 431542 najbardziej obniżał ekspresję *DNMT3A*, równocześnie jest to związek, który zaindukował pojawienie się komórek NG2-pozytywnych, co jest zgodne z przytoczonymi wyżej wynikami.

PD 0325901 jest związkiem, który selektywnie i wydajnie blokuje aktywność MEK1, co z kolei powoduje zahamowanie fosforylacji kinazy ERK. Szlak sygnałowy MAPK/ERK reguluje wiele procesów komórkowych, w tym transkrypcję genów, proliferację, różnicowanie, apoptozę czy migrację (Chang i Karin 2001). Wykazano, że zaburzenia w jego funkcjonowaniu są obecne w wielu typach nowotworów. Dlatego też obecnie wiele z jego inhibitorów jest testowanych, jako potencjalne związki przeciwnowotworowe. Jednym z takich związków jest badany w tej pracy PD 0325901. Wykazano, że ma on zdolność hamowania proliferacji komórek nowotworowych. Obecnie jest testowany na pacjentach z rozsianymi guzami litymi w trakcie drugiej fazy badań klinicznych (<https://clinicaltrials.gov/show/NCT02022982>).

W toku prowadzonych badań wykazano, że w hodowli HUCB-NSC z dodatkiem PD 0325901 dochodzi do zwiększenia ekspresji genu *NANOG*, ale tylko w komórkach hodowanych w 5% stężeniu tlenu. Nie zaobserwowano natomiast zmian w ekspresji innych genów typowych dla stanu pluripotencji (*OCTA*, *SOX2*, *REX1*).

Podobne wyniki uzyskał Li (2016), który wykazał że mESC hodowane przez 5 dni w obecności PD 0325901 i witaminy C charakteryzowały się znaczną hipometylacją, porównywalną do tej, która jest obserwowana w pierwotnych komórkach płciowych. Ponadto stwierdzono zwiększoną ekspresję *Nanog* i *Klf4*, brak wpływu na ekspresję *Oct4* i *Sox2* i obniżenie ilości mRNA dla *Rex1* (Li i wsp. 2016).

W niniejszej pracy zobszserowano mniejsze zróżnicowanie morfologiczne komórek HUCB-NSC hodowanych z dodatkiem PD 0325901, w szczególności w 5% O₂. Równocześnie wykazano zależny od stężenia tlenu wpływ PD 0325901 na ekspresję genów związanych z różnicowaniem neuralnym. Porównanie ekspresji genów na poziomie mRNA pozwoliło stwierdzić istotne zwiększenie ilości mRNA dla β -*TUBULINY III* w komórkach hodowanych w 21% O₂, efekt ten nie był obserwowany natomiast w warunkach 5% O₂, gdzie z kolei stwierdzono nieznaczne zwiększenie ekspresji genu kodującego *PDGFR α* . Oba te geny kodują białka będące markerami typowymi dla komórek na wczesnym stadium różnicowania. Jeśli natomiast porównamy ekspresję markerów bardziej zaawansowanego różnicowania, czy to na poziomie mRNA (*MAP2*, *SI00 β*), czy też białka (NF200, MAP2, NG2, GalC), nie obserwujemy większych różnic w stosunku do komórek kontrolnych. Ponadto, dodanie PD 0325901 nie zmieniało potencjału do proliferacji HUCB-NSC. Ostatecznie, trudno jest stwierdzić, czy związek ten bardziej sprzyja macierzystości HUCB-NSC, czy wręcz przeciwnie promuje ich różnicowanie.

Z danych literaturowych wynika, że pulsacyjna aktywacja szlaku sygnałowego MAPK/ERK powoduje wyjście komórek ze stanu uśpienia i przejście do fazy S cyklu komórkowego. Wykazano, że jego zahamowanie, za pomocą PD 0325901, zmniejsza amplitudę tej pulsacji wpływając znacznie na zmniejszenie liczby dzielących się komórek (Albeck i wsp. 2013). Z drugiej strony zastosowanie tego związku w połączeniu z innymi związkami niskocząsteczkowymi (Y27632 i CHIR99021) powoduje zwiększenie proliferacji hESC i utrzymanie stanu pluripotencji (Tsutsui i wsp. 2011). W przypadku HUCB-NSC nie zaobserwowano istotnego wpływu PD 0325901 na proliferację, w żadnym zbadanych warunków tlenowych.

W prezentowanej pracy nie stwierdzono również wpływu PD 0325901 na ekspresję *HIF1α*, jednakże wykazano znaczne zwiększenie ilości mRNA dla *HIF2α* w obu badanych warunkach tlenowych, co było zbieżne z istotnym obniżeniem ekspresji metylotransferaz DNA (*DNMT3A* i *DNMT3B*).

Ostatnie badania wykazały, że poza hamowaniem aktywności MEK1, PD 0325901 może również pośrednio hamować aktywność DNMT3B i DNMT3L, prowadząc tym samym do zmniejszenia poziomu globalnej metylacji DNA (Li i wsp. 2016). W naszych badaniach wykazaliśmy, że to właśnie PD 0325901 powoduje największe obniżenie ekspresji *DNMT3B* w HUCB-NSC w obu wariantach tlenowych. Co ciekawe, koreluje to z istotnym podwyższeniem ekspresji *HIF2α*, prawdopodobnie istnieje więc odwrotna zależność pomiędzy ekspresją tych genów, ale nie jest to związane z warunkami tlenowymi w hodowli.

Kolejnym z badanych w niniejszej pracy związków był RG 108 - inhibitor metylotransferaz DNA - DNMT3A i DNMT3B, które powodują metylację DNA *de novo*, to znaczy tworzą nowy wzór metylacji, a nie tylko przepisują już istniejący z drugiej nici DNA. Tworzenie nowych wzorów metylacji zachodzi podczas embriogenezy i różnicowania się komórek, kiedy to jedne geny są włączane, a inne wyłączane. DNMT3A i DNMT3B są syntetyzowane na wysokim poziomie w komórkach niezróżnicowanych (bardzo wysoka ekspresja w ESC), a w miarę postępującej specjalizacji komórek ich poziom spada (Turek-Plewa i Jagodziński 2005).

Na podstawie uzyskanych wyników, można stwierdzić, że stężenie tlenu w hodowli ma istotny wpływ na odpowiedź HUCB-NSC na dodatek RG 108. Zaobserwowano, że hodowla HUCB-NSC w 21% O₂ w obecności RG 108 nie zmieniała istotnie ekspresji genów związanych ze stanem pluripotencjalności (*NANOG*, *OCTA*, *SOX2*, *REX1*), jednakże komórki hodowane w 5% O₂ charakteryzowały się wyraźnie podwyższoną ekspresją genów *OCTA* i *NANOG*. Również na poziomie białka, w hodowli w 5% stężeniu tlenu, zaobserwowano pojawienie się ekspresji czynników transkrypcyjnych OCT4 i SOX2. Wyniki te są zgodne z badaniami przeprowadzonymi wcześniej w naszym zespole, w których RG 108 wraz z TSA był z powodzeniem stosowany do reprogramowania HUCB-NSC *in vitro* (Szablowska-Gadomska i wsp. 2012).

Z drugiej strony odmienne wyniki i bardzo nietypowe podejście do badań nad reprogramowaniem przedstawili w swojej pracy Asadi i współpracownicy (2015).

W swoich badaniach postanowili przetestować wpływ różnych związków niskocząsteczkowych, w tym RG 108 na reprogramowanie komórek *in vivo*. Przez 7 lub 14 dni podawali myszom do prawej komory mózgu testowane substancje, a następnie oceniali zmiany w ekspresji genów związanych ze stanem pluripotencjalności i markerów NSC. Z ich badań wynika, że RG 108 nie zmienia ekspresji badanych genów (Asadi i wsp. 2015).

Analiza ekspresji genów różnicowania neuralnego pozwoliła stwierdzić, że dodatek RG 108 nie zmieniał istotnie poziomu ekspresji genów związanych z różnicowaniem neuronalnym (β -*TUBULINA III*, *MAP2*), choć w przypadku komórek hodowanych w 5% O₂ obserwowany jest nieznaczny spadek poziomu tych genów.

Podczas neurogenezy metylotransferaza DNA - DNMT3A jest obecna w NPC w SVZ i w dojrzałych neuronach a także w oligodendrocytach w OUN. Wiadomo, że istotnie wpływa na proliferację, dojrzewanie i różnicowanie NSC (Feng i wsp. 2005). Może to tłumaczyć uzyskane przez nas wyniki. Zablockowanie aktywności DNMT3A, a także obserwowane zmniejszenie ekspresji genu kodującego to białko, mogło wpłynąć na zahamowanie różnicowania neuronalnego. Co ciekawe, równocześnie zaobserwowano, że w tych samych warunkach obniżone stężenie tlenu i RG 108 promuje zaindukowanie różnicowania w kierunku oligodendrocytów (zwiększenie ekspresji *PDGFR α* na poziomie mRNA), ale tylko na wczesnym etapie - analiza PCR nie wykazała ekspresji genu *OLIG2*, a na poziomie białka nie obserwowaliśmy ekspresji NG2 ani GalC.

Dodatek RG 108 w 21% O₂ powodował zwiększenie potencjału proliferacyjnego HUCB-NSC, podczas gdy w 5% O₂ potencjał ten wyraźnie się zmniejszał. Jest to tendencja przeciwna do tej obserwowanej w komórkach kontrolnych, nietraktowanych żadnym z badanych związków.

Ośrodkowy układ nerwowy posiada pewien potencjał do naprawy uszkodzeń związanych ze zmianami demielinizacyjnymi. Obecnie uważa się, że jest to związane z procesem rekrutacji i różnicowania komórek prekursorowych oligodendrocytów (ang. *Oligodendrocyte Precursor Cells*, OPCs), wykazujących ekspresję m.in. *OLIG2* (ang. *oligodendrocyte transcription factor*), *NG2* (ang. *neural/glial antigen 2*), *PDGFR α* (ang. *platelet-derived growth factor receptor α*) (Rivers i wsp. 2008). Żeby mogło dojść do remielinizacji, OPC muszą zostać aktywowane i przetransportowane do miejsca uszkodzenia. Tam ulegają różnicowaniu do zmielinizowanych oligodendrocytów i mogą naprawiać pozbawione osłonki aksony (Franklin i wsp. 2002, Akkermann i wsp.

2016). Korzystnym więc byłoby uzyskanie populacji wykazującej cechy OPC. W prezentowanej pracy, pomimo zmniejszenia tendencji komórek do różnicowania w kierunku neuronalnym i zwiększenia ekspresji genów *PDGFR α* i *SI00 β* na poziomie mRNA, na poziomie białka nie zaobserwowano ekspresji markerów różnicowania glejowego (NG2, GalC, GFAP), co może być związane ze stosunkowo krótkim czasem hodowli (5 dni) z dodatkiem RG 108.

Analizując wyniki badań niniejszej rozprawy widzimy, że obecność RG 108 nie zmieniała ekspresji genów *HIF1 α* i *HIF2 α* , co wskazuje, że wpływ tego związku na różnicowanie i proliferację komórek HUCB-NSC był zależny od stężenia tlenu, ale mechanizm jego działania nie był związany z czynnikami indukowanymi hipoksją. Natomiast analiza ekspresji genów kodujących enzymy związane z modyfikacjami epigenetycznymi pozwoliła stwierdzić, że zahamowanie działania metylotransferaz DNA (DNMT3A i DNMT3B) przez RG 108 powoduje istotne podwyższenie ekspresji *HDAC2* w obu wariantach tlenowych i równocześnie zmniejsza ekspresję genów dla *DNMT3A* i *DNMT3B* na poziomie mRNA.

RG 108 był stosowany również w badaniach na ludzkich mezenchymalnych komórkach macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego (ang. *Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells*, BM-MSC), w których oceniano jego wpływ na proces starzenia się. Wykazano, że zahamowanie aktywności DNMT3A i DNMT3B wiązało się ze zmniejszoną ekspresją genów charakterystycznych dla starzenia się komórek, a także poprawiało zdolność komórek do migracji, zwiększało ich przeżywalność i odporność na stres oksydacyjny (Oh i wsp. 2015). Przytoczone wyżej dane literaturowe, jak i wyniki uzyskane przez autorkę sugerują, że RG 108 może być użyteczny w otrzymaniu komórek o lepszych właściwościach do zastosowania w terapii komórkowej.

Ostatnim z testowanych związków była trichostatyna A (TSA) – inhibitor deacetylaz histonowych z klasy I i II. HDAC są zaangażowane bezpośrednio i pośrednio w wiele procesów komórkowych, w tym proliferację, różnicowanie czy programowaną śmierć komórki. Wykazano również, że pełnią one istotną rolę w rozwoju wielu tkanek i narządów, a ich brak powoduje wiele defektów rozwojowych często skutkujących śmiercią rozwijającego się zarodka. Deacetylazy histonowe są zaangażowane w formowanie się układu nerwowego, poprzez regulację ekspresji określonych genów, które są włączane lub wyłączane na poszczególnych etapach

rozwoju. Wykazano, że podczas rozwoju OUN istnieje określony wzór ekspresji poszczególnych HDAC, spośród których najistotniejsze wydają się być HDAC1 i HDAC2 (Jaworska i wsp. 2015).

W naszych badaniach wykazaliśmy, że dodatek TSA i różne warunki tlenowe wpływają na losy rozwojowe komórek HUCB-NSC. Udowodniliśmy, że w hodowli z 5% stężeniem tlenu ekspresja genów związanych z pluripotencją jest istotnie, bo około 8-krotnie zwiększona (*OCTA*, *NANOG*). Również ocena ekspresji tych genów na poziomie białka pozwoliła stwierdzić pojawienie się czynników transkrypcyjnych *OCT4* i *SOX2* w obu badanych wariantach tlenowych.

W toku prowadzonych badań nie znaleziono dowodów na to, że dodatek TSA powoduje zwiększenie ekspresji β -*TUBULINY III* na poziomie mRNA. Zaobserwowano również, że komórki hodowane w warunkach 21% O₂ na poziomie mRNA nie wykazują ekspresji NF200 (innego markera różnicowania neuronalnego). Jednak, co ciekawe, w warunkach 5% O₂ zaobserwowano znaczny wzrost ekspresji *MAP2*. Ponadto analizując zdjęcia uzyskane za pomocą mikroskopii konfokalnej zaobserwowano, że znaczna część populacji badanych komórek wykazuje zróżnicowany fenotyp – są większe, mają wyraźne długie wypustki, jak również na poziomie białka charakteryzują się ekspresją β -*TUBULINY III*, NF200 i *MAP2*. Dodatkowo oceniając ilości komórek zdolnych do proliferacji stwierdzono, że w hodowli w 5% O₂ z dodatkiem TSA znacznie zmniejszyła się liczba dzielących się komórek. Może to sugerować, że część komórek uległa terminalnemu zróżnicowaniu do neuronów tracąc zdolność do podziałów. Zaobserwowano, że zwiększenie ekspresji genów związanych z różnicowaniem w kierunku glejowym (*PDGFR α* i *SI00 β*) było obecne tylko na poziomie mRNA i tylko w HUCB-NSC hodowanych w 5% stężeniu tlenu. Nie stwierdzono natomiast obecności komórek GFAP, NG2 ani GalC pozytywnych w preparatach analizowanych metodą immunocytochemiczną.

Z danych literaturowych wynika, że HDAC1 jest czynnikiem promującym ekspresję genów odpowiedzialnych za różnicowanie neuralne (Cunliffe i Casaccia-Bonelfil 2006). Podczas rozwoju HDAC1 jest obecny głównie w proliferujących komórkach progenitorowych o potencjale do różnicowania się zarówno w neurony, jak i komórki glejowe. W przypadku różnicowania w kierunku neuronalnym ilość HDAC1 zmniejsza się na korzyść HDAC2. Natomiast w przypadku różnicowania w kierunku glejowym HDAC1 przeważa nad HDAC2. (MacDonald i Roskams 2008). Sugeruje się, że aktywność HDAC2 jest niezbędna do zablokowania różnicowania w kierunku

astrocytarnym, prawdopodobnie poprzez zablokowanie ekspresji genów związanych z tym różnicowaniem. Natomiast HDAC1 prawdopodobnie hamuje transkrypcję genów niezbędnych do różnicowania neuronalnego (Humphrey i wsp. 2008).

Poza różnicowaniem HDAC1 i HDAC2 odgrywają istotną rolę w regulacji proliferacji NSC i NPC. Z doświadczeń przeprowadzonych na szczurzych zarodkowych progenitorach neuralnych wynika, że zablokowanie HDAC za pomocą TSA skutkuje znacznym zahamowaniem proliferacji, zwiększonym różnicowaniem neuronalnym i zmniejszonym różnicowaniem w kierunku astrocytów. Ponadto TSA nie wpływało na żywotność i migrację testowanych komórek (Liu i wsp. 2012B). Obserwowany w niniejszej pracy spadek proliferacji HUCB-NSC hodowanych w 5% O₂ z dodatkiem TSA jest zbieżny z przytoczonymi danymi literaturowymi.

Zablokowanie aktywności deacetylaz histonów w szczurzych NPC za pomocą innego inhibitora HDAC – suberoilolanilidu kwasu hydroksamowego (ang. *suberoylanilide hydroxamic acid*, SAHA), który swoją aktywnością bardzo przypomina TSA, skutkowało wydajniejszym różnicowaniem w kierunku neuronalnym. Zaobserwowano ponad dwukrotny wzrost ilości komórek wykazujących ekspresję β -TUBULINY III, przy równoczesnym zmniejszeniu o połowę ilości uzyskanych oligodendrocytów. Równocześnie nie wykazano wpływu zahamowania aktywności HDAC na różnicowanie w kierunku astrocytarnym (Siebzehnrubl i wsp. 2007).

W uzyskanych przez nas wynikach obserwujemy bardzo istotny wzrost ekspresji genów kodujących obie deacetylazy (*HDAC1* i *HDAC2*) w obu badanych wariantach tlenowych. Wydaje się, że zastosowanie TSA i 5% O₂ spowodowało uzyskanie stosunkowo heterogennej populacji progenitorów, której część wykazuje większy potencjał do różnicowania w kierunku neuronalnym (podwyższenie ekspresji *MAP2*), a część w glejowym (podwyższenie ekspresji *PDGFRa* i *SI00 β*). Jednak w komórkach tych na poziomie białka nie są obserwowane markery glejowe (NG2, GalC, GFAP), co sugeruje zahamowanie procesu dalszego różnicowania komórek w tym kierunku. Wyniki uzyskane w tej pracy są więc zbieżne z wyżej przytoczonymi, uzyskanymi przez Liu i współpracowników (2012).

Według autorki rozprawy jedną z bardziej interesujących obserwacji jest fakt, że zahamowanie aktywności deacetylaz histonowych skutkowało ich zwiększoną ekspresją na poziomie mRNA, przy czym efekt ten był większy w warunkach obniżonego stężenia tlenu i w stosunku do *HDAC2*. Ekspresja *HDAC2* była ponad 8-krotnie wyższa w komórkach hodowanych z dodatkiem TSA w 5% O₂ i około 3-krotnie wyższa w 21%

O₂ w stosunku do komórek hodowanych w warunkach kontrolnych. Wyraźna różnica w poziomie ekspresji świadczy o tym, że stężenie tlenu w hodowli reguluje ekspresję badanych deacetylaz, w szczególności *HDAC2*, jednak jest to regulacja niezależna od stężenia czynników HIF.

Z dostępnej literatury wynika, że zablokowanie działania HDAC prowadzi do hiperacetylacji HIF1 α , co skutkuje zmniejszeniem jego stabilności, również w warunkach obniżonego stężenia tlenu, co z kolei przyspiesza jego degradację (Jeong i wsp. 2002). W naszych badaniach dodatek TSA nie zmieniał ekspresji czynników indukowanych hipoksją.

Wykazano również, że TSA ma działanie przeciwnowotworowe – hamuje wzrost komórek i zapobiega formowaniu się guzów (Finnin i wsp. 1999). Ekspresja poszczególnych deacetylaz jest zaburzona w różnych typach nowotworów, co powoduje, że można specyficznym dobrać HDACi do określonej choroby. Ponadto wykazano, że komórki nowotworowe są bardziej wrażliwe na działanie HDACi, łatwiej dochodzi w nich do zahamowania cyklu komórkowego, różnicowania czy zaindukowania apoptozy (Minucci i Pelicci 2006, Kim i Bae 2011). Tak więc, w przypadku populacji komórek, z których niektóre wykazywałyby cechy nowotworowe, dodatek TSA mógłby skutkować zmniejszeniem ich liczby. Dlatego też związek ten wydaje się być atrakcyjnym narzędziem do modulacji losu komórkowego z punktu widzenia zastosowania w terapii komórkowej.

Związki niskocząsteczkowe są niewątpliwie przydatnym narzędziem do sterowania kierunkiem rozwoju komórek, co udowodniły wyniki uzyskane w tej pracy, a także w wielu innych, w których wykazano możliwość uzyskania homogennej populacji komórek o potencjalnym zastosowaniu w terapii komórkowej. Są one idealnymi kandydatami do badania biologii komórek, za ich pomocą można analizować kanoniczne i alternatywne drogi szlaków sygnałowych, interakcje między szlakami czy też modelować ich zaburzenia w różnych chorobach. Jednakże fakt, że obecnie na rynku dostępne są tysiące związków, a do modulacji większości szlaków sygnałowych możemy zastosować kilka lub czasem kilkanaście różnych substancji powoduje, że każda z nich jest badana w ograniczony sposób. Ponadto, często doświadczenia wykonywane są na różnych modelach komórkowych. Z reguły są to komórki nowotworowe, w których normalne funkcjonowanie szlaków przekazywania sygnału czy też wzór zmian epigenetycznych są zaburzone. Badany jest wpływ związków

niskocząsteczkowych na różnorodne procesy zachodzące w komórce. Większość badań dotyczy proliferacji i / lub apoptozy, sprawdzając tym samym potencjał testowanych substancji w terapii antynowotworowej. Ostatnio popularne stało się również stosowanie związków niskocząsteczkowych do reprogramowania komórek, niewiele jest jednak badań testujących ich wpływ na kierunek rozwoju komórek, a tym bardziej na to jak stężenie tlenu w hodowli zmienia odpowiedź komórek na stosowany związek. Wszystko to bardzo utrudnia porównywanie wyników uzyskanych przez autorkę z tymi dostępnymi w literaturze, a co za tym idzie wyciąganie bardziej złożonych wniosków.

6.3. Wpływ hodowli trójwymiarowej na różnicowanie i proliferację HUCB-NSC

W niniejszej pracy testowano 4 rodzaje rusztowań zbudowanych z trzech materiałów – kolagenu wzbogaconego siarczanem chondroityny (ang. *chondroitin sulphate*, CS), białek występujących z keratyną i chitozanu o właściwościach elektroprzewodzących.

Potencjalnie, wydaje się, że zastosowanie specjalnie zaprojektowanych systemów biologicznych (komórki macierzyste porastające rusztowania) może mieć szerokie zastosowanie w leczeniu ostrych i przewlekłych chorób i urazów neurologicznych. W literaturze można znaleźć wiele doniesień przedstawiających wpływ różnych typów rusztowań, zastosowanych biomateriałów, czy ich funkcjonalizacji na regenerację układu nerwowego. Jednakże badania te często wykonane są na modelach zwierzęcych i po przeniesieniu do kliniki dają odmienne wyniki.

Kryteria, jakie musi spełniać rusztowanie, zależą od rodzaju tkanki, do której są adresowane. W terapiach układu nerwowego najczęściej próbuje się używać substancji będących składowymi ECM, w tym białek (np.: kolagenu, lamininy czy fibronektyny), peptydów (np.: RGD, IKAV, YIGSR) czy polisacharydów (np.: chitozanu, alginianu, hialuronian) (Das i Zouani 2014, Elliott Donaghue i wsp. 2014). Uważa się, że idealne rusztowania do regeneracji OUN powinny odzwierciedlać macierz zewnątrzkomórkową obecną w mózgu, czy rdzeniu kręgowym.

W naszych badaniach wykazaliśmy, że spośród testowanych rusztowań kolagen wzbogacony siarczanem chondroityny stanowi najlepsze mikrośrodowisko 3D do hodowli HUCB-NSC w stadium progenitorów neuralnych. Poniżej omówione zostaną wyniki otrzymane na stosowanych w tej pracy rusztowaniach.

Badano dwa rodzaje rusztowań wykonanych z białek współwystępujących z keratyną - były to rusztowania o charakterze włókien, długości około 1 cm i mniejsze, mające postać prostokątów. Rusztowania te były wykonane w Zakładzie Neuropeptydów IMDiK PAN, metodą dwuetapową, w której pierwszym etapem jest oczyszczanie włosów z warstwy tłuszczowej i aktywacja ich powierzchni, a następnie dwukrotne trawienie za pomocą pepsyny (Lipkowski i wsp. 2009). Rusztowania uzyskane przez ten sam zespół zbudowane z białek współwystępujących z keratyną pochodzących z włosów mysich były z powodzeniem stosowane, jako naturalne allogeniczne opatrunki w leczeniu ran. Opatrunki wykonane z białek związanych z keratyną, ze względu na swoją biokompatybilność, ułatwiały przyleganie i wzrost komórek, ich migrację i różnicowanie w miejscu uszkodzenia, przyspieszały leczenie rany, a także zapobiegały wtórnym infekcjom (Konop i wsp. 2017). Ponadto rusztowania wykonane na bazie keratyny, pochodzącej z ludzkich włosów były już wcześniej badane w naszym zespole, jako podłoże do hodowli HUCB-NSC. W badaniach tych wykazano, że tylko w hodowli trójwymiarowej możliwe było uzyskanie z HUCB-NSC populacji neuronów (TUJ1 i MAP2-pozytywnych) zdolnych do generowania spontanicznych potencjałów czynnościowych (Jurga i wsp. 2009).

Na podstawie uzyskanych zdjęć z mikroskopu konfokalnego możemy stwierdzić, że HUCB-NSC lepiej przylegały do dłuższych rusztowań keratynowych, niż do małych - zaobserwowano na nich rozpląszczone komórki z większą ilością wypustek. W obu przypadkach obecne są komórki β -TUBULINA III i GFAP pozytywne, co odpowiada wczesnemu stadium zróżnicowania neuralnego, ale tylko na dłuższych rusztowaniach keratynowych zaobserwowano komórki wykazujące ekspresję MAP2 - markera bardziej zaawansowanych neuronów. Jednoznacznie wskazuje to na fakt, że geometria powierzchni, na której rosną komórki może wpływać na ich różnicowanie, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi wcześniej w naszym zespole. HUCB-NSC hodowane na domenach pokrytych białkami macierzy zewnątrzkomórkowej o kształcie małych kwadratów pozostawały niezróżnicowane, natomiast linie promowały różnicowanie neuronalne (Zychowicz i wsp. 2012). Trudno porównywać jednoznacznie wyniki otrzymane na funkcjonalizowanych powierzchniach 2D (domeny funkcjonalne o różnym kształcie) z wynikami uzyskanymi w niniejszej pracy, gdzie komórki rosną i różnicują się w układzie trójwymiarowym i na znacznie większej powierzchni, niemniej obserwowana jest pewna zgodność uzyskanych wyników - podobna tendencja

do różnicowania neuronalnego i kierunkowego wzrostu wypustek aksonalnych na powierzchniach większych i o wydłużonym kształcie.

Keratyna, jako podłoże do hodowli komórek, ma wiele zalet. Jest materiałem biozgodnym, biodegradowalnym, łatwo się ją pozyskuje i formuje. Podobnie jak inne naturalnie otrzymywane materiały, keratyna charakteryzuje się obecnością sekwencji aminokwasowych podobnych do tych, które występują w ECM, co umożliwia jej oddziaływanie z komórkowymi integrynami, ułatwiając tym samym przyleganie i migrację komórek. Rusztowania zbudowane z keratyny mogą być dodatkowo sfunkcjonalizowane różnymi substancjami (np. czynnikami wzrostu, substancjami przeciwzapalnymi, antybiotykami itp.), które będą stopniowo uwalniane wraz z postępującą degradacją (Vasconcelos i Cavaco-Paulo 2013, Konop i wsp. 2017).

Badania wykorzystujące rusztowania keratynowe, otrzymane z ludzkich włosów, wykazały, że mogą one być z powodzeniem stosowane w regeneracji nerwów obwodowych. Stwierdzono, że hydrożelowe rusztowania, uzyskane z białek występujących we włosach, zwiększają proliferację, przyleganie i aktywność komórek Schwanna. Ponadto, dzięki dużej plastyczności hydrożelu możliwe było wypełnienie miejsca uszkodzenia materiałem, który miał właściwości neuroprzewodzące. Po przeszczepieniu do modelu zwierzęcego zaobserwowano regenerację włókien nerwowych w miejscach uszkodzenia i zdecydowaną poprawę przewodnictwa nerwowo-mięśniowego (Sierpiński i wsp. 2008).

Pomimo, iż stosowane w tej pracy rusztowania otrzymane na bazie białek współwystępujących z keratyną umożliwiały przyleganie i wzrost HUCB-NSC, nie były one najkorzystniejszym z badanych rusztowań.

Chitozan jest naturalnym, biodegradowalnym i biokompatybilnym polisacharydem, który nie wykazuje właściwości cytotoksycznych. Promuje przyleganie, proliferację i różnicowanie komórek, sprzyja wydzielaniu przez nie białek ECM, w tym kolagenu. Wykazano również, że jest doskonałym materiałem do tworzenia opatrunków (Chhabra i wsp. 2016). Ze względu na swój dodatni ładunek i potencjał elektroprzewodzący ma od duży wpływ na różnicowanie się wielu typów komórek. Wykazano, że rusztowania chitozanowe mogą być z powodzeniem stosowane w regeneracji uszkodzeń nerwów obwodowych. Włókna i membrany chitozanowe stanowią doskonałe podłoże do hodowli komórek Schwanna, które pełnią istotną rolę w regeneracji nerwów (Yuan i wsp. 2004).

W naszych badaniach rusztowania chitozanowe nie stanowiły atrakcyjnego podłoża do hodowli HUCB-NSC. Obserwowaliśmy niewielką liczbę komórek zasiedlających rusztowania. Ponadto te komórki, które były obecne na rusztowaniach w czasie hodowli (widoczne na przyżyciowych zdjęciach z mikroskopu świetlnego) odrywały się/wypłukiwały podczas przygotowywania materiału do analizy w mikroskopie elektronowym i konfokalnym, co sugeruje, że nie były silnie związane z materiałem tworzącym rusztowanie. Dodatkową wadą tego biomateriału jest bardzo duża autofluorescencja, która uniemożliwiała analizę immunocytochemiczną.

Kolagen, w szczególności typu pierwszego, jest jednym z najpowszechniej występujących białek ECM w tkankach i z tego względu jest powszechnie stosowany do tworzenia rusztowań w inżynierii tkankowej. Wykazano, że sprzyja przyleganiu komórek, jest biokompatybilny i biodegradowalny, łatwy w obróbce i może być nośnikiem dla różnych substancji. Ostatnie badania z wykorzystaniem rusztowań kolagenowych z liniowo uporządkowanymi włóknami wykazały, że NSC chętnie porastały rusztowania, które promowały ich różnicowanie w kierunku neuronalnym. Dodatkowo, rusztowania te zostały wzbogacone o fragment przeciwciała skierowanego przeciwko receptorom dla EGF. Wykazano, że taka funkcjonalizacja sprzyjała różnicowaniu neuronalnemu i zwiększonemu wydłużaniu neurytów *in vitro*. Ponadto, po przeszczepieniu tak wzbogaconych rusztowań do szczurzego modelu uszkodzenia rdzenia kręgowego zaobserwowano zwiększoną neurogenezę aktywowanych przez uszkodzenie endogennych NSC. Komórki te nie tylko różnicowały się w neurony, ale również odtwarzały funkcjonalne połączenie w uszkodzonym rdzeniu, a zwierzęta którym wszczepiono rusztowania odzyskały częściowo zdolności motoryczne (Fan i wsp. 2017).

Zastosowane przez autorkę rozprawy rusztowania kolagenowe były wzbogacone siarczanem chondroityny (CS) (Pietrucha 2015). Wzbogacenie siarczanem chondroityny, jak również siarczanem heparyny, ma na celu polepszenie właściwości mechanicznych rusztowań kolagenowych (Chen i wsp. 2017). Uważa się również, że polisacharydy, w tym CS, w OUN zapewniają odpowiednią architekturę niszy. W swoich badaniach, Huang i współpracownicy wykazali, że rusztowania wykonane z kolagenu, siarczanu chondroityny i aldehydu glutarowego promowały różnicowanie i migrację endogennych NPC w modelu urazowego uszkodzenia mózgu (Huang i wsp. 2012). Inne badania wykazały, że rusztowania kolagenowe wzbogacone siarczanem

heparyny drukowane za pomocą drukarki 3D stanowiły doskonałe, biokompatybilne podłoże do hodowli NSC *in vitro*, a po przeszczepieniu do uszkodzonego rdzenia kręgowego zmniejszały różnicowanie astrocytarne i zwiększały liczbę komórek NF200-pozytywnych. Szczury, którym wszczepiono rusztowania wykazywały znaczną poprawę funkcji motorycznych (Chen i wsp. 2017).

Użyte w niniejszej rozprawie rusztowania kolagenowe miały postać elastycznych gąbek z porami o zróżnicowanej wielkości (średnia średnica 31 μm) połączonymi ze sobą mniejszymi lamelami. Pory i ich połączenia ułożone były w różnych płaszczyznach zapewniając idealne warunki do interakcji międzykomórkowych. Charakteryzowały się stosunkowo dużą powierzchnią, na której możliwy był wzrost komórek (Pietrucha 2015, Pietrucha i wsp. 2017).

Przeprowadzone badania pozwoliły stwierdzić, że rusztowania kolagenowe wzbogacone siarczanem chondroityny stanowią dobre podłoże do hodowli HUCB-NSC. Komórki są obecne zarówno na powierzchni jak i wewnątrz rusztowania, dobrze przylegają do jego powierzchni. Fakt, że preparatyka związana z wizualizacją w elektronowym mikroskopie skaningowym nie spowodowała oderwania komórek (jak miało to miejsce w przypadku innych testowanych rusztowań), świadczy o tym, że komórki są na nich lepiej związane z biomateriałem. Nie zaobserwowano negatywnego wpływu rusztowań kolagenowych wzbogaconych siarczanem chondroityny na HUCB-NSC, a analiza immunocytochemiczna pozwoliła stwierdzić obecność komórek zdolnych do proliferacji (Ki67-pozytywne). Co ciekawe, analiza ekspresji genów na poziomie mRNA wykazała pojawienie się ekspresji *OLIG1* i *OLIG2* (markerów związanych z różnicowaniem oligodendrocytarnym) w populacji HUCB-NSC hodowanych na rusztowaniach kolagenowych w 21% O_2 . Ponadto, komórki hodowane na rusztowaniach w 5% O_2 nie posiadały ekspresji *MAP2*, co świadczy o tym, że mikroarchitektura środowiska i stężenie tlenu w hodowli wpływają na kierunek drogi różnicowania NSC.

Spośród badanych rusztowań tylko rusztowania kolagenowe były zasiedlane przez taką liczbę komórek, która umożliwiła izolację odpowiedniej ilości i jakości mRNA, a co za tym idzie analizę ekspresji genów na poziomie mRNA. Wszystkie badane materiały wykazywały autofluorescencję, co utrudniało analizę immunocytochemiczną. Najintensywniejszą autofluorescencję miały rusztowania chitozanowe, następnie keratynowe, a najmniejszą kolagenowe. Komórki zdolne do proliferacji (Ki67 pozytywne) były obecne zarówno na rusztowaniach keratynowych,

jak i kolagenowych, ze względu na autofluorescencję nie mogliśmy jednoznacznie stwierdzić jak na zdolność do proliferacji HUCB-NSC wpływa chitozan.

Nieustające poszukiwania i próby stworzenia funkcjonalnych trójwymiarowych konstruktów zbudowanych z biomateriałów i komórek są niezwykle ważnym aspektem współczesnych badań. Są ważne ze względu na możliwość ich bezpośredniego zastosowania w regeneracji uszkodzonych tkanek, ale również stanowią doskonałą alternatywę dla części badań wykorzystujących zwierzęta (np. testowanie dawek czy cytotoksyczności leków). Poszukuje się odpowiednich biomateriałów i komórek dedykowanych dla określonych typów tkanek i uszkodzeń. Ponadto badania z wykorzystaniem systemów trójwymiarowych pozwalają nam lepiej zrozumieć biologię komórek i mikrośrodowiska, w którym przebywają w organizmie.

Postęp w dziedzinie bioinżynierii materiałowej i komórek macierzystych daje nadzieję na otrzymanie takich rusztowań, które poza funkcją matrycy umożliwią integrację komórek i będą funkcjonowały jako „biologiczne rusztowania” odtwarzając interakcje komórkowe, architekturę i naturalne funkcje tkanek.

6.4. Konkluzje

W pierwszej części pracy określone zostały warunki *in vitro*, w których synergiczne działanie 5% stężenia tlenu i inhibitora DMOG prowadzi do: akumulacji czynnika HIF1 α , zwiększonej ekspresji genu *NANOG* (genu typowego dla stanu pluripotencjalności), wzrostu tempa proliferacji komórek, zwiększonego potencjału do różnicowania w kierunku neuronalnym (wyższa ekspresja *MAP2*) oraz podwyższonej ekspresji genów kodujących czynniki HIF i enzymy epigenetyczne (*DNMT3A*, *DNMT3B*, *HDAC1*, *HDAC2*). Świadczy to o możliwości otrzymania w hodowli *in vitro* populacji komórek w „stanie biwalentnym”, zdolnych jednocześnie do proliferacji prowadzącej do samoodnowy i różnicowania neuralnego oraz wskazuje na mechanizm molekularny, w którym istotną rolę odgrywa wzrost aktywności genów kodujących czynniki HIF oraz enzymy epigenetyczne.

Kolejny etap pracy, w którym porównywano różne typy rusztowań trójwymiarowych oraz badano wpływ związków niskocząsteczkowych na przeżywalność, proliferację i różnicowanie HUCB-NSC wskazał na rusztowanie kolagenowe funkcjonalizowane siarczanem chondroityny, jako optymalne dla hodowli

populacji pozostającej w gotowości do proliferacji i różnicowania, oraz określił rodzaj suplementacji hodowli związkami niskocząsteczkowymi dla otrzymania hodowli różnicującej w kierunku neuronalnym, bądź glejowym.

Otrzymane wyniki umożliwiają określenie sposobu prekondycjonowania komórek w celu otrzymania populacji kompetentnej terapeutycznie do leczenia określonych schorzeń neurologicznych.

7. STRESZCZENIE

W związku z szybkim rozwojem medycyny regeneracyjnej istnieje potrzeba zoptymalizowania zarówno metod otrzymywania, jak i prowadzenia hodowli komórek macierzystych do celów klinicznych. Takie komórki powinny zachować, pomimo hodowli *in vitro*, wysoki potencjał proliferacyjny, progenitorowy charakter, zdolność do ukierunkowanego różnicowania oraz stabilność genetyczną. Wymienione cechy charakteryzują komórki progenitorowe zasiedlające w organizmie nisze komórkowe. Odtworzenie w hodowli *in vitro* podobnych warunków daje nadzieję na stworzenie wystandaryzowanych procedur umożliwiających otrzymanie kompetentnych terapeutycznie komórek.

W naszej opinii do najważniejszych czynników warunkujących zachowanie progenitorowego charakteru komórek należą: stężenie tlenu panujące w docelowym narządzie, skład macierzy zewnątrzkomórkowej oraz struktura przestrzenna.

Celem przedstawionych w rozprawie badań była ocena wpływu ww. czynników na różnicowanie *in vitro* neuralnych komórek macierzystych otrzymanych z krwi pępowinowej (HUCB-NSC). W toku prowadzonych badań przeprowadzono analizę zarówno fenotypową jak i molekularną komórek poddanych różnym czynnikom środowiskowym takim jak: 1) zmienne stężenie tlenu, 2) obecność w środowisku czynników różnicujących oraz związków niskocząsteczkowych wpływających na status epigenetyczny i szlaki sygnałowe związane z proliferacją i różnicowaniem komórki 3) powierzchnie hodowlane 2D vs 3D o różnym składzie biochemicznym i geometrii.

Początkowo oceniono wpływ dwóch stężeń tlenu: 5% (typowego dla nisz komórek macierzystych w mózgu) oraz 21% (atmosferycznego) na różnicowanie i proliferację HUCB-NSC znajdujących się na różnych etapach rozwoju (komórki niezróżnicowane, wczesne progenitory vs komórki zróżnicowane w kierunku neuronalnym). Następnie podjęto próbę wyjaśnienia, czy obserwowana odpowiedź komórek związana jest z akumulacją czynników indukowanych hipoksją (HIF), wykorzystując do tego celu inhibitor hydroksylazy prolinowej – DMOG, prowadzący do akumulacji HIF1 α . W kolejnym etapie badań sprawdzano, czy stężenie tlenu w hodowli zmienia odpowiedź komórek na działanie inhibitorów szlaków sygnałowych (PD 0325901, SB 431542) i enzymów epigenetycznych (RG 108, TSA). W ostatnim etapie badań komórki zostały wysiane na powierzchnie 2D oraz różne pod względem składu i geometrii rusztowania 3D.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że obniżone (fizjologiczne) stężenie tlenu w hodowli stymuluje proliferację komórek, ale wpływ ten jest istotny na wczesnych etapach rozwoju - w przypadku tej pracy na etapie progenitorów neuralnych. W komórkach tych, hodowanych w warunkach 5% stężenia tlenu oraz w obecności inhibitora DMOG wykazaliśmy akumulację czynników HIF, przy zwiększonej ekspresji genu *NANOG* (genu pluripotencjalności) oraz wzroście tempa proliferacji komórek. Ponadto komórki te charakteryzowały się również zwiększonym potencjałem do różnicowania w kierunku neuronalnym (wyższa ekspresja *MAP2*), a także podwyższoną ekspresją genów kodujących enzymy epigenetyczne (*DNMT3A*, *DNMT3B*, *HDAC1*, *HDAC2*). Na podstawie powyższych wyników, do dalszych doświadczeń z wykorzystaniem związków niskocząsteczkowych i rusztowań trójwymiarowych wybrano komórki w stadium progenitorów neuralnych.

W kolejnych doświadczeniach wykazano, że badane związki niskocząsteczkowe (TSA, RG 108, PD 0325901, SB 431542) wpływają na ekspresję genów związanych z różnicowaniem HUCB-NSC, a zmiany te zależą od warunków tlenowych. Zaobserwowano, że stosując PD 0325901 lub SB 431542 w obecności 21% tlenu można uzyskać populację komórek charakteryzującą się wyższą ekspresją genów i białek typowych dla różnicowania neuronalnego. Odpowiednio, po zastosowaniu TSA w obecności 5% stężenia tlenu uzyskujemy heterogenną populację, wykazującą ekspresję genów i białek typowych dla neuronów i astrocytów, a po zastosowaniu SB 431542 otrzymujemy komórki ukierunkowane oligodendrocytarnie. Ponadto wykazano, że zastosowanie większości związków niskocząsteczkowych w obecności 5% stężenia tlenu obniża nieznacznie zdolność komórek do proliferacji.

Prowadzenie hodowli komórkowej w warunkach 3D utrzymuje komórki w stadium progenitorów neuralnych, a efekt ten jest wzmacniany w obecności 5% stężenia tlenu. Zdolności do przeżycia i różnicowania tych komórek w znacznym stopniu zależą od składu biochemicznego rusztowania i powierzchni adhezyjnej. Najkorzystniejsze wyniki uzyskano stosując rusztowania kolagenowe wzbogacone siarczanem chondroityny o dużych porach i znacznej powierzchni przylegania.

Podsumowując otrzymane wyniki, wydaje się, że sterując warunkami tlenowymi, składem biochemicznym środowiska (obecnością związków niskocząsteczkowych) oraz strukturą przestrzenną podłoża można wpływać na kierunek rozwoju komórek i w sposób kontrolowany przygotowywać je do zastosowania klinicznego.

8. ABSTRACT

Due to the challenges of regenerative medicine there is an urgent need to optimize the way of obtaining as well as the methods of culture of stem cells for therapeutic applications.

Despite of *in vitro* culture such cells should maintain high potential for proliferation, progenitor character, ability for directed differentiation and genetic stability. The features mentioned above are characteristic for progenitor cells growing *in vivo* in stem cell niches. Creating such microenvironment in *in vitro* conditions gives the hope for establishing standardized procedures enabling to obtain therapeutically competent cell populations.

In our opinion the most important factors necessary to maintain cell progenitor stage in their *in vitro* environment are: the level of the oxygen tension typical for the target tissue, composition of the extracellular matrix and three-dimensional organization of the growth surface.

The aim of the presented in this thesis studies was to estimate the influence of mentioned above factors *for in vitro* growth and differentiation of human umbilical cord blood derived neural stem cells (HUCB-NSC). In the course of our studies the experiments were conducted for phenotypic and molecular analysis of the HUCB-NSC maintained at different stages of development (nondifferentiated neural stem cells, neural progenitors and committed into neuronal lineage) were exposed to diverse environmental factors. They included: 1) different oxygen level conditions, 2) the presence of differentiating factors and small molecules influencing cell epigenetic status and intracellular pathways regulating proliferation and neural differentiation; 3) 2D vs 3D culture conditions of different composition and geometry.

At the first phase of the studies the influence of different oxygen tension: 5% (typical for neural stem cell *in vivo* niche) and 21% (atmospheric) on differentiation and proliferation of HUCB-NSC maintained at different stages of development was established. This was followed by the molecular investigation establishing whether the observed cellular responses are linked to the activation of the hypoxia inducible factors (HiF's), where the molecular tool was DMOG - the proline hydroxylase inhibitor, causing cellular accumulation of HIF1 α . The following stage of the study was to investigate whether different oxygen conditions would change HUCB-NSC response to

inhibitors of the selected cellular pathways (PD 0325901, SB 431542) and epigenetic enzymes (RG 108, TSA). At the end, the cells were seeded on 2D and 3D scaffolds of different geometry and composition.

In the course of experiments it was shown, that the investigated small molecules (TSA, RG 108, PD 0325901, SB 431542) influence the expression of the genes of HUCB-NSC neural differentiation depending upon oxygen conditions. Accordingly using PD 0325901 or SB 431542 in the presence of 21% O₂ we can obtain the cell population with elevated expression of genes and proteins typical for neuronal differentiation. When TSA or RG 108 are applied in the presence of 5% O₂ the cells are expressing genes typical for astrocytes, while SB 431542 in 5% O₂ level is inducing oligodendrocytic markers. Moreover, we have shown that most of the applied small molecules in 5% O₂ have negative influence on cell proliferation.

The environment of the 3D scaffolds and accommodate maintain the cells in the neural progenitor stage, and this effect is enhanced by the low oxygen conditions. The ability of these cells to survive and differentiate highly depend upon the biochemical content of the scaffold and the adhesive surface. The best results were obtained when the chondroitin sulfate modified collagen scaffolds with large pores and adhesive surface were applied.

In summary the obtained results indicated, that manipulating with the oxygen conditions, biochemical content of the environment (the presence of the small molecules) and the dimensional structure of the surface we can influence cell developmental fate and in the standardized and controllable way prepare the cells required for clinical applications.

9. PIŚMIENICTWO

ALBECK JG, MILLS GB, BRUGGE JS (2013) Frequency-modulated pulses of ERK activity transmit quantitative proliferation signals. *Mol Cell*. 49(2): 249-261.

ALI SA, PAPPAS IS, PARNAVELAS JG (1998) Collagen type IV promotes the differentiation of neuronal progenitors and inhibits astroglial differentiation in cortical cell cultures. *Brain Res Dev Brain Res*. 110(1): 31-38.

ALLO M, BUGGIANO V, FEDEDA JP, PETRILLO E, SCHOR I, DE LA MATA M, AGIRRE E, PLASS M, EYRAS E, ELELA SA, KLINCK R, CHABOT B, KORNBLIHTT AR (2009) Control of alternative splicing through siRNA-mediated transcriptional gene silencing. *Nature Structural & Molecular Biology* 16:717–724.

AGUIRRE A, RUBIO ME, GALLO V (2010) Notch and EGFR pathway interaction regulates neural stem cell number and self-renewal. *Nature*. 467(7313): 323-327.

AHN S, JOYNER AL (2005) *In vivo* analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature* 437(7060): 894-897.

AHMED I, PONERY AS, NUR-E-KAMAL A, KAMAL J, MESHEL AS, SHEETZ MP, SCHINDLER M, MEINERS S (2007) Morphology, cytoskeletal organization, and myosin dynamics of mouse embryonic fibroblasts cultured on nanofibrillar surfaces. *Mol Cell Biochem*. 301(1-2): 241-249.

AKKERMANN R, JADASZ JJ, AZIM K, KÜRY P (2016) Taking Advantage of Nature's Gift: Can Endogenous Neural Stem Cells Improve Myelin Regeneration? *Int J Mol Sci*. 17(11).

ALTMAN J (1962) Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*. 135, 1127-1128.

ASADI S, DEGHAN S, HAJIKARAM M, MOWLA SJ, AHMADIANI AA, JAVAN M (2015) Comparing The Effects of Small Molecules BIX-01294, Bay K8644, RG-108 and Valproic Acid, and Their Different Combinations on Induction of Pluripotency Marker-Genes by Oct4 in The Mouse Brain. *Cell J*. 16(4): 416-425.

AUGUSTYNIAK J, ZYCHOWICZ M, PODOBINSKA M, BARTA T, BUZANSKA L. (2014) Reprogramming of somatic cells: possible methods to derive safe, clinical-grade human induced pluripotent stem cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 74(4):373-82.

BAIN J, PLATER L, ELLIOTT M, SHPIRO N, HASTIE CJ, MCLAUCHLAN H, KLEVERNIC I, ARTHUR JS, ALESSI DR, COHEN P (2007) The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. *Biochem J*. 408(3): 297-315.

- BALLAS N, GRUNSEICH C, LU DD, SPEH JC, MANDEL G (2005) REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell*. 121(4):645-657.
- BERNSTEIN BE, MEISSNER A, LANDER ES. (2007) The mammalian epigenome. *Cell* 128, 669–681.
- BERNSTEIN BE, MIKKELSEN TS, XIE X, KAMAL M, HUEBERT DJ, CUFF J, FRY B, MEISSNER A, WERNIG M, PLATH K, JAENISCH R, WAGSCHAL A, FEIL R, SCHREIBER SL, LANDER ES (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*. 125, 315-326.
- BIANCO P, BARKER R, BRÜSTLE O, CATTANEO E, CLEVERS H, DALEY GQ, DE LUCA M, GOLDSTEIN L, LINDVALL O, MUMMERY C, ROBEY PG, SATTLER DE SOUSA E BRITO C, SMITH A (2013) Regulation of stem cell therapies under attack in Europe: for whom the bell tolls. *EMBO J*. 32(11): 1489-1495.
- BINH NH, AOKI H, TAKAMATSU M, HATANO Y, HIRATA A, TOMITA H, HARA A (2014) Time-sensitive effects of hypoxia on differentiation of neural stem cells derived from mouse embryonic stem cells *in vitro*. *NEUROL RES*. 36(9): 804-813.
- BISCEGLIE V (1933) Über die antineoplastische immunität; heterologe einpflanzung von tumoren in hühner-embryonen. *Ztschr Krebsforsch*; 40:122-140.
- BISWAS D, JIANG P (2016) Chemically Induced Reprogramming of Somatic Cells to Pluripotent Stem Cells and Neural Cells. *Int J Mol Sci*. 17(2):226.
- BOHELER KR. (2009) Stem cell pluripotency: a cellular trait that depends on transcription factors, chromatin state and a checkpoint deficient cell cycle. *J Cell Physiol*. 221, 10-17.
- BOND AM, BHALALA OG, KESSLER JA (2012) The dynamic role of bone morphogenetic proteins in neural stem cell fate and maturation. *Dev Neurobiol*. 72(7): 1068-1084.
- BROUSSE B, MAGALON K, DURBEC P, CAYRE M (2015) Region and dynamic specificities of adult neural stem cells and oligodendrocyte precursors in myelin regeneration in the mouse brain. *Biol Open*. 4(8): 980-992.
- BRUŽAUSKAITĖ I, BIRONAITĖ D, BAGDONAS E, BERNOTIENĖ E (2016) Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes-different cell effects. *Cytotechnology*. 68(3): 355-369.
- BURKE JF, YANNAS IV, QUINBY WC JR, BONDOC CC, JUNG WK (1981) Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg*. 194:413-428.

- BUSUTTIL RA, RUBIO M, DOLLÉ ME, CAMPISI J, VIJG J (2003) Oxygen accelerates the accumulation of mutations during the senescence and immortalization of murine cells in culture. *Aging Cell*. 2(6): 287-294.
- BUTCHER DT, ALLISTON T, WEAVER VM (2009) A tense situation: forcing tumour progression. *Nat Rev Cancer*.9(2): 108-122.
- BUŻAŃSKA L, MACHAJ EK, ZABLOCKA B, POJDA Z, DOMAŃSKA-JANIK K (2002) Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features *in vitro*. *Journal of Cell Science* 15: 2131–2138.
- BUŻAŃSKA L, STACHOWIAK E, STACHOWIAK MK, DOMAŃSKA-JANIK K (2001) Neural stem cell line derived from human umbilical cord blood—morphological and functional properties. *Journal of Neurochemistry* 85 (Suppl. 2), 33.
- BUŻAŃSKA L, HABICH A, JURGA M, SYPECKA J, DOMAŃSKA-JANIK K (2005) Human cord blood-derived neural stem cell line--possible implementation in studying neurotoxicity. *Toxicol In Vitro*. 19(7):991-9.
- BUŻAŃSKA L, JURGA M, DOMAŃSKA-JANIK K (2006A) Neuronal differentiation of human umbilical cord blood neural stem-like cell line. *Neurodegener Dis*. 3(1-2): 19-26.
- BUŻAŃSKA L, JURGA M, STACHOWIAK EK, STACHOWIAK MK, DOMAŃSKA-JANIK K (2006B) Neural stem-like cell line derived from a nonhematopoietic population of human umbilical cord blood. *Stem Cells Dev*. 15(3): 391-406.
- BUZANSKA L, SYPECKA J, NERINI-MOLTENI S, COMPAGNONI A, HOGBERG HT, DEL TORCHIO R, DOMAŃSKA-JANIK K, ZIMMER J, COECKE S (2009A) A human stem cell-based model for identifying adverse effects of organic and inorganic chemicals on the developing nervous system. *Stem Cells*. 27(10):2591-601
- BUŻAŃSKA L, RUIZ A, ZYCHOWICZ M, RAUSCHER H, CERIOTTI L, ROSSI F, COLPO P, DOMAŃSKA-JANIK K, COECKE S (2009B) Patterned growth and differentiation of human cord blood-derived neural stem cells on bio-functionalized surfaces. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 69(1):24-36.
- BUZANSKA L, ZYCHOWICZ M, RUIZ A, CERIOTTI L, COECKE S, RAUSCHER H, SOBANSKI T, WHELAN M, DOMAŃSKA-JANIK K, COLPO P, ROSSI F (2010) Neural stem cells from human cord blood on bioengineered surfaces--novel approach to multiparameter bio-tests. *Toxicology*. 270(1):35-42.
- BUŻAŃSKA L, ZYCHOWICZ M, SARNOWSKA A, DOMAŃSKA-JANIK K (2013) Bioinżynieria niszy neuralnych komórek macierzystych. *Postępy Biochemii* 59(2): 175-186.

CAJAL, S. RAMÓN Y. (1913) Estudios sobre la Degeneración y Regeneración del Sistema Nervioso. 2

CALVI LM, ADAMS GB, WEIBRECHT KW, WEBER JM, OLSON DP, KNIGHT MC, MARTIN RP, SCHIPANI E, DIVIETI P, BRINGHURST FR, MILNER LA, KRONENBERG HM, SCADDEN DT (2003) Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 425(6960): 841-846.

CASAROSA S, BOZZI Y, CONTI L (2014) Neural stem cells: ready for therapeutic applications? *Mol Cell Ther*. 2:31.

CIEMERYCH MA (2008) Zarodkowe komórki macierzyste - w poszukiwaniu pluripotencji. *Postępy Biologii Komórki* 35 (2): 183-205.

CIPOLLESCHI MG, DELLO SBARBA P, OLIVOTTO M (1993) The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* 82(7): 2031-2037.

CHANG L, KARIN M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 410(6824): 37-40.

CHEN C, ZHAO ML, ZHANG RK, LU G, ZHAO CY, FU F, SUN HT, ZHANG S, TU Y, LI XH (2017) Collagen/heparin sulfate scaffolds fabricated by a 3D bioprinter improved mechanical properties and neurological function after spinal cord injury in rats. *J Biomed Mater Res A*. 105(5): 1324-1332.

CHEN CS, TAN J, TIEN J (2004) Mechanotransduction at cell-matrix and cell-cell contacts. *Annu Rev Biomed Eng*. 6: 275-302.

CHENG X, KUMAR S, POSFAI J, PFLUGRATH JW, ROBERTS RJ (1993) Crystal structure of the HhaI DNA methyltransferase complexed with S-adenosyl-L-methionine. *Cell* 74, 299-307.

CHENN A, WALSH CA (2002) Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science*. 297(5580): 365-369.

CHHABRA P, TYAGI P, BHATNAGAR A, MITTAL G, KUMAR A (2016) Optimization, characterization, and efficacy evaluation of 2% chitosan scaffold for tissue engineering and wound healing. *J Pharm Bioallied Sci*. 8(4): 300-308.

CHICK WL, LIKE AA, LAURIS V (1975) Beta cell culture on synthetic capillaries: an artificial endocrine pancreas. *Science* 187:847-849.

CHOMCZYNSKI P, SACCHI N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162(1): 156-159.

- COSSON S, OTTE EA, HEZAVEH H, COOPER-WHITE JJ (2015) Concise review: tailoring bioengineered scaffolds for stem cell applications in tissue engineering and regenerative medicine. *Stem Cells Transl Med.* 4(2): 156-164.
- CUNLIFFE VT, CASACCIA-BONEFIL P (2006). Histone deacetylase 1 is essential for oligodendrocyte specification in the zebrafish CNS. *Mech Dev* 123: 24-30.
- DALBY MJ, GADEGAARD N, OREFFO RO (2014) Harnessing nanotopography and integrin-matrix interactions to influence stem cell fate. *Nat Mater.* 13(6): 558-569.
- DALEY WP, PETERS SB, LARSEN M (2008) Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci.* 121(Pt 3): 255-264.
- DAS RK, ZOUANI OF (2014) A review of the effects of the cell environment physicochemical nanoarchitecture on stem cell commitment. *Biomaterials.* 35(20):5278-93.
- DE FILIPPIS L, DELIA D (2011) Hypoxia in the regulation of neural stem cells. *Cell Mol Life Sci.* 68(17): 2831-2844.
- DENHAM M, DOTTORI M (2011) Neural differentiation of induced pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol* 793: 99-110.
- DENOMME MM, MANN MR (2013) Maternal control of genomic imprint maintenance. *Reprod Biomed Online.* 27(6): 629-636.
- DEPPE J, POPP T, EGEA V, STEINRITZ D, SCHMIDT A, THIERMANN H, WEBER C, RIES C (2016) Impairment of hypoxia-induced HIF-1 α signaling in keratinocytes and fibroblasts by sulfur mustard is counteracted by a selective PHD-2 inhibitor. *Arch Toxicol.* 90(5): 1141-1150.
- DITYATEV A, SEIDENBECHER CI, SCHACHNER M (2010) Compartmentalization from the outside: the extracellular matrix and functional microdomains in the brain. *Trends Neurosci.* 33(11): 503-512.
- DOETSCH F (2003) A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 13(5): 543-550.
- DOMANSKA-JANIK K, BUZANSKA L, LUKOMSKA B (2008) A novel, neural potential of non-hematopoietic human umbilical cord blood stem cells. *Int J Dev Biol.* 52(2-3):237-48.
- DRELA K, LECH W, FIGIEL-DABROWSKA A, ZYCHOWICZ M, MIKULA M, SARNOWSKA A, DOMANSKA-JANIK K (2016) Enhanced neuro-therapeutic potential of Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells culture. *Cytotherapy.* 18(4): 497-509.

- DRELA K, SARNOWSKA A, SIEDLECKA P, SZABLOWSKA-GADOMSKA I, WIELGOS M, JURGA M, LUKOMSKA B, DOMANSKA-JANIK K (2014) Low oxygen atmosphere facilitates proliferation and maintains undifferentiated state of umbilical cord mesenchymal stem cells in an hypoxia inducible factor-dependent manner. *Cytotherapy*. 16(7): 881-892.
- DUBIEL M, LASOTA J, TYLKO G, OSYCZKA AM (2015) Rola ścieżek sygnalizacji BMP w procesach osteogenezy *Postępy Biologii Komórki* 42(4): 645-665.
- DUNWOODIE SL (2009) The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. *Dev Cell*. 17(6): 755-773.
- EBRAHIMI B (2016) Chemicals as the Sole Transformers of Cell Fate. *Int J Stem Cells*. 9(1): 9-20.
- EFE JA, DING S (2011) The evolving biology of small molecules: controlling cell fate and identity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 366(1575): 2208-2221.
- ELIASSON P, JÖNSSON JI (2010) The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol*. 222(1): 17-22
- ELLIOTT DONAGHUE I, TAM R, SEFTON MV, SHOICHET MS (2014) Cell and biomolecule delivery for tissue repair and regeneration in the central nervous system. *J Control Release*. 190:219-27.
- ERECINSKA M, SILVER IA (2001) Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol*. 128(3): 263-276.
- ERIKSSON PS, PERFILIEVA E, BJÖRK-ERIKSSON T, ALBORN AM, NORDBORG C, PETERSON DA, GAGE FH. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*. 4(11): 1313-1317
- EZASHI T, DAS P, ROBERTS RM (2005) Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(13): 4783-4788.
- FAN C, LI X, XIAO Z, ZHAO Y, LIANG H, WANG B, HAN S, LI X, XU B, WANG N, LIU S, XUE W, DAI J (2017) A modified collagen scaffold facilitates endogenous neurogenesis for acute spinal cord injury repair. *Acta Biomater*. 51: 304-316.
- FAN G, MARTINOWICH K, CHIN MH, HE F, FOUSE SD, HUTNICK L, HATTORI D, GE W, SHEN Y, WU H, TEN HOEVE J, SHUAI K, SUN YE (2005) DNA methylation controls the timing of astroglialogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development*. 132(15): 3345-3356.
- FENG J, CHANG H, LI E, FAN G. (2005) Dynamic expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b in the central nervous system. *J Neurosci Res*. 79(6):734-46.

- FENG Y, BORRELLI M, REICHL S, SCHRADER S, GEERLING G (2014) Review of alternative carrier materials for ocular surface reconstruction. *Curr Eye Res.* 2014 Jun;39(6):541-52.
- FINNIN MS, DONIGIAN JR, COHEN A, RICHON VM, RIFKIND RA, MARKS PA, BRESLOW R, PAVLETICH NP (1999) STRUCTURES OF A HISTONE DEACETYLASE HOMOLOGUE BOUND TO THE TSA AND SAHA INHIBITORS. *NATURE.* 401(6749): 188-193.
- FOLKMAN J, HAHNFELDT P, HLATKY L (2000) Cancer: looking outside the genome. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1(1): 76-79.
- FORRISTAL CE, WRIGHT KL, HANLEY NA, OREFFO RO, HOUGHTON FD (2010) Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction.* 139(1): 85-97.
- FOTI SB, CHOU A, MOLL AD, ROSKAMS AJ (2013) HDAC inhibitors dysregulate neural stem cell activity in the postnatal mouse brain. *Int J Dev Neurosci.* 31(6):434-447.
- FRANKLIN RJ (2002) Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nat Rev Neurosci.* 3(9): 705-714.
- GAPP K, WOLDEMICHAEL BT, BOHACEK J, MANSUY IM. (2014) Epigenetic regulation in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. *Neuroscience;* 264: 99-111.
- GIACHINO C, BASAK O, LUGERT S, KNUCKLES P, OBERNIER K, FIORELLI R, FRANK S, RAINETEAU O, ALVAREZ-BUYLLA A, TAYLOR V (2014) Molecular diversity subdivides the adult forebrain neural stem cell population. *Stem Cells.* 32(1):70-84.
- GIESE AK, FRAHM J, HÜBNER R, LUO J, WREE A, FRECH MJ, ROLFS A, ORTINAU S (2010) Erythropoietin and the effect of oxygen during proliferation and differentiation of human neural progenitor cells. *BMC Cell Biol.* 11:94.
- GOLDMAN SA (2006) Stem and Progenitor Cell-Based Therapy of the Central Nervous System: Hopes, Hype, and Wishful Thinking. *Cell Stem Cell.* 18(2):174-88.
- GONZALO S, JACO I, FRAGA MF, CHEN T, LI E, ESTELLER M, BLASCO MA (2006) DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat Cell Biol.* 8, 416-424.
- GRAHAM A, FRANCIS-WEST P, BRICKELL P, LUMSDEN A (1994) The signalling molecule BMP4 mediates apoptosis in the rhombencephalic neural crest. *Nature.* 372(6507): 684-696.
- GREENWALD I (2012) Notch and the awesome power of genetics. *Genetics.* 191(3): 655-669.

- GUILAK F, COHEN DM, ESTES BT, GIMBLE JM, LIEDTKE W, CHEN CS (2009) Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell Stem Cell*. 5(1): 17-26.
- GUNATILLAKE P, MAYADUNNE R, ADHIKARI R (2006) Recent developments in biodegradable synthetic polymers. *Biotechnol Annu Rev*. 12:301-347.
- GUO JU, SU Y, ZHONG C, MING GL, SONG H. (2011) Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* 145, 423-434
- GUSTAFSSON MV, ZHENG X, PEREIRA T, GRADIN K, JIN S, LUNDKVIST J, RUAS JL, POELLINGER L, LENDAHL U, BONDESSON M (2005) Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell*. 9(5): 617-628.
- HABICH A, SZABLOWSKA-GADOMSKA I, ZAYAT V, BUZANSKA L, DOMAŃSKA-JANIK K (2013) Epigenetic and molecular signature of human umbilical cord blood-derived neural stem cell (HUCB-NSC) neuronal differentiation. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 73(1): 143-156.
- HAIGIS MC, SINCLAIR DA (2010) Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol*. 5, 253-295.
- HARRIS GM, PIROLI ME, JABBARZADEH E (2014) Deconstructing the Effects of Matrix Elasticity and Geometry in Mesenchymal Stem Cell Lineage Commitment. *Adv Funct Mater*. 24(16): 2396-2403.
- HAUSNER T, SCHMIDHAMMER R, ZANDIEH S, HOPF R, SCHULTZ A, GOGOLEWSKI S, HERTZ H, REDL H (2007) Nerve regeneration using tubular scaffolds from biodegradable polyurethane. *Acta Neurochir Suppl*. 100:69-72.
- HEARD E, CLERC P, AVNER P (1997) X-chromosome inactivation in mammals. *Annu Rev Genet*. 31, 571-610.
- HJELMELAND MD, HJELMELAND AB, SATHORNSUMETEE S, REESE ED, HERBSTREITH MH, LAPING NJ, FRIEDMAN HS, BIGNER DD, WANG XF, RICH JN (2004) SB-431542, a small molecule transforming growth factor-beta-receptor antagonist, inhibits human glioma cell line proliferation and motility. *Mol Cancer Ther*. 3(6):737-745.
- HITOSHI S, ALEXSON T, TROPEPE V, DONOVIEL D, ELIA AJ, NYE JS, CONLON RA, MAK TW, BERNSTEIN A, VAN DER KOOY D (2002) Notch pathway molecules are essential for the maintenance, but not the generation, of mammalian neural stem cells. *Genes Dev*. 16(7): 846-858.
- HORDYJEWSKA A, POPIOŁEK Ł, HORECKA A (2015) Characteristics of hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. *Cytotechnology*. 67(3): 387-396.

HSIEH J, GAGE FH (2004) Epigenetic control of neural stem cell fate. *Curr Opin Genet Dev.* 14(5): 461-469.

HUANG KF, HSU WC, CHIU WT, WANG JY (2012) FUNCTIONAL IMPROVEMENT AND NEUROGENESIS AFTER COLLAGEN-GAG MATRIX IMPLANTATION INTO SURGICAL BRAIN TRAUMA. *BIOMATERIALS* 33(7): 2067-2075.

HUANG Z, FUJIWARA K, MINAMIDE R, HASEGAWA K, YOSHIKAWA K (2013) Necdin controls proliferation and apoptosis of embryonic neural stem cells in an oxygen tension-dependent manner. *J Neurosci.* 33(25): 10362-10373.

HUMPHREY GW, WANG YH, HIRAI T, PADMANABHAN R, PANCHSION DM, NEWELL LF, MCKAY RD, HOWARD BH (2008). Complementary roles for histone deacetylases 1, 2, and 3 in differentiation of pluripotent stem cells. *Differentiation* 76: 348-356.

INMAN GJ, NICOLÁS FJ, CALLAHAN JF, HARLING JD, GASTER LM, REITH AD, LAPING NJ, HILL CS (2002) SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol* 62(1): 65-74.

ISHIMURA A, MAEDA R, TAKEDA M, KIKKAWA M, DAAR IO, MAENO M (2000) Involvement of BMP-4/msx-1 and FGF pathways in neural induction in the *Xenopus* embryo. *Dev Growth Differ.* 42: 307–316

IVANOVIC Z (2009) Hypoxia or in situ normoxia: the stem cell paradigm. *Journal of Cellular Physiology*, 219,2: 271–275,

JAWORSKA J, ZIEMKA-NALECZ M, ZALEWSKA T (2015) Histone deacetylases 1 and 2 are required for brain development. *Int J Dev Biol.* 59(4-6): 171-177.

JEONG JW, BAE MK, AHN MY, KIM SH, SOHN TK, BAE MH, YOO MA, SONG EJ, LEE KJ, KIM KW (2002) Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell.* 111(5): 709-720.

JEPSEN K, SOLUM D, ZHOU T, MCEVILLY RJ, KIM HJ, GLASS CK, HERMANSON O, ROSENFELD MG (2007) SMRT-mediated repression of an H3K27 demethylase in progression from neural stem cell to neuron. *Nature.* 450(7168): 415-419.

JURGA M, LIPKOWSKI AW, LUKOMSKA B, BUZANSKA L, KURZEPA K, SOBANSKI T, HABICH A, COECKE S, GAJKOWSKA B, DOMANSKA-JANIK K (2009) Generation of functional neural artificial tissue from human umbilical cord blood stem cells. *Tissue Eng Part C Methods.* 15(3): 365-372.

- JENUWEIN T, ALLIS CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293(5532):1074-1080.
- KATOH M, KATOH M (2007) WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res.* 13(14): 4042-4045.
- KE Q, COSTA M (2006) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol.* 70(5): 1469-1480.
- KEMPERMANN G, SONG H, GAGE FH (2015) Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7(9):a018812.
- KEREVER A, SCHNACK J, VELLINGA D, ICHIKAWA N, MOON C, ARIKAWA-HIRASAWA E, EFIRD JT, MERCIER F (2007) Novel extracellular matrix structures in the neural stem cell niche capture the neurogenic factor fibroblast growth factor 2 from the extracellular milieu. *Stem Cells.* 25(9): 2146-2157.
- KESHET I, LIEMAN-HURWITZ J, CEDAR H (1986) DNA methylation affects the formation of active chromatin. *Cell* 44, 535-543.
- KIM HJ, BAE SC (2011) HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS: MOLECULAR MECHANISMS OF ACTION AND CLINICAL TRIALS AS ANTI-CANCER DRUGS. *AM J TRANSL RES.* 3(2): 166-179.
- KLIMCZAK A, SIEMIONOW M, FUTOMA K, JUNDZILL A, PATRZALEK D (2017) Assessment of immunologic, proangiogenic and neurogenic properties of human peripheral nerve epineurium for potential clinical application. *Histol Histopathol.* 25:11875.
- KONOP M, SULEJCZAK D, CZUWARA J, KOSSON P, MISICKA A, LIPKOWSKI AW, RUDNICKA L (2017) THE ROLE OF ALLOGENIC KERATIN-DERIVED DRESSING IN WOUND HEALING IN A MOUSE MODEL. *Wound Repair Regen.* 25(1): 62-74.
- KOMIYA Y, HABAS R (2008) Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis.* 4(2): 68-75.
- KOUZARIDES T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693-705.
- KRIAUCIONIS S, HEINTZ N (2009) The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* 324, 929-930.
- KRISHNA L, DHAMODARAN K, JAYADEV C, CHATTERJEE K, SHETTY R, KHORA SS, DAS D (2016) Nanostructured scaffold as a determinant of stem cell fate. *Stem Cell Res Ther.* 7(1): 188.
- KUBIAK J, CIEMERYCH MA (2013) Od Gurdon do Yamanaki, czyli krótka historia reprogramowania komórek. *Postępy Biochemii* 59(2): 124-130.
- LADEWIG J, MERTENS J, KESAVAN J, DOERR J, POPPE D, GLAUE F, HERMS S, WERNET P, KOGLER G, MULLER FJ, KOCH P, BRUSTLE O (2012) Small molecules enable highly efficient neuronal conversion of human fibroblasts. *Nat Methods.* 9(6): 575-578.

- LAI K, KASPAR BK, GAGE FH, SCHAFFER DV (2002) Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. *Nat Neurosci.* 6(1): 21-27.
- LAMB TM, KNECHT AK, SMITH WC, STACHEL SE, ECONOMIDES AN, STAHL N, YANCOPOLOUS GD (1993) Neural induction by the secreted polypeptide noggin. *Science.* 262: 713–718.
- LAMB TM, KNECHT AK, SMITH WC, STACHEL SE, ECONOMIDES AN, STAHL N, YANCOPOLOUS GD, HARLAND RM (2001) Proteolytic cleavage of Chordin as a switch for the dual activities of Twisted gastrulation in BMP signaling. *Development.* 128(22): 4439-4447.
- LANGER R, VACANTI J (2016) Advances in tissue engineering. *J Pediatr Surg.* 51(1):8-12.
- LARONI A, DE ROSBO NK, UCCELLI A (2015) Mesenchymal stem cells for the treatment of neurological diseases: Immunoregulation beyond neuroprotection. *Immunol Lett.* 168(2):183-190.
- LARRAÍN J, OELGESCHLÄGER M, KETPURA NI, REVERSADE B, ZAKIN L, DE ROBERTIS EM (2001) Proteolytic cleavage of Chordin as a switch for the dual activities of Twisted gastrulation in BMP signaling. *Development.* 128(22): 4439-4447.
- LAURENT L, WONG E, LI G, HUYNH T, TSIRIGOS A, ONG CT, LOW HM, KIN SUNG KW, RIGOUTSOS I, LORING J, WEI CL (2010) Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res.* 20(3): 320-331.
- LECH W, FIGIEL-DABROWSKA A, SARNOWSKA A, DRELA K, OBTULOWICZ P, NOSZCZYK BH, BUZANSKA L, DOMANSKA-JANIK K (2016) Phenotypic, Functional, and Safety Control at Preimplantation Phase of MSC-Based Therapy. *Stem Cells Int.* 2016:2514917
- LEE SJ, CHOI JS, PARK KS, KHANG G, LEE YM, LEE HB (2004) Response of MG63 osteoblast-like cells onto polycarbonate membrane surfaces with different micropore sizes. *Biomaterials* 25:4699–4707.
- LEIPZIG ND, SHOICHET MS (2009) The effect of substrate stiffness on adult neural stem cell behavior. *Biomaterials.* 30(36): 6867-6878.
- LI C, LIU B, ZHONG S, WANG H (2016) MEK inhibitor PD0325901 and vitamin C synergistically induce hypomethylation of mouse embryonic stem cells. *Oncotarget.* 7(26): 39730-39739.
- LI E, BEARD C, JAENISCH, R. (1993) Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* 366, 362-365.
- LI E, BESTOR TH, JAENISCH R. (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 12; 69(6): 915-926.

- LI W, SUN W, ZHANG Y, WEI W, AMBASUDHAN R, XIA P, TALANTOVA M, LIN T, KIM J, WANG X, KIM WR, LIPTON SA, ZHANG K, DING S (2011) Rapid induction and long-term self-renewal of primitive neural precursors from human embryonic stem cells by small molecule inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108(20): 8299-8304.
- LI X, ZHAO X. (2008) Epigenetic Regulation of Mammalian Stem Cells. *Stem Cells Dev* 17, 1043-1052.
- LIAN ZR, XU YF, WANG XB, GONG JP, LIU ZJ (2012) Suppression of histone deacetylase 11 promotes expression of IL-10 in kupffer cells and induces tolerance following orthotopic liver transplantation in rats. *J Surg Res.* 174, 359-368.
- LIESI P, HAGER G, DODT HU, SEPPÄLÄ I, ZIEGLGÄNSBERGER W (1995) Domain-specific antibodies against the B2 chain of laminin inhibit neuronal migration in the neonatal rat cerebellum. *J Neurosci Res.* 40(2): 199-206.
- LILJA T, HELDRING N, HERMANSON O (2012) Like a rolling histone: Epigenetic regulation of neural stem cells and brain development by factors controlling histone acetylation and methylation. *Biochim Biophys Acta.* 1830, 2354-2360.
- LIM DA, TRAMONTIN AD, TREVEJO JM, HERRERA DG, GARCÍA-VERDUGO JM, ALVAREZ-BUYLLA A (2000) Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron.* 28(3): 713-726.
- LIN T, AMBASUDHAN R, YUAN X, LI W, HILCOVE S, ABUJAROUR R, LIN X, HAHM HS, HAO E, HAYEK A, DING S (2009) A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods.* 6(11): 805-808.
- LIPKOWSKI AW, GAJKOWSKA B, GRABOWSKA A, KURZEPA K (2009) Keratin-associated protein micromaterials for medical and cosmetic applications. *POLIMERY* 54: 386 - 388
- LISTER R, PELIZZOLA M, DOWEN RH, HAWKINS RD, HON G, TONTI-FILIPPINI J, NERY JR, LEE L, YE Z, NGO QM, EDSALL L, ANTOSIEWICZ-BOURGET J, STEWART R, RUOTTI V, MILLAR AH, THOMSON JA, REN B, ECKER JR (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315-322.
- LIU GH, YI F, SUZUKI K, QU J, IZPISUA BELMONTE JC (2012A) Induced neural stem cells: a new tool for studying neural development and neurological disorders. *Cell Res.* 22(7): 1087-1091.
- LIU H, WU H, WANG Y, WANG Y, WU X, JU S, WANG X (2012B) Inhibition of class II histone deacetylase blocks proliferation and promotes neuronal differentiation of the embryonic rat neural progenitor cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 72(4): 365-376.

- LIU J, SATO C, CERLETTI M, WAGERS A (2010) Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Curr Top Dev Biol.* 92:367-409.
- LIU X, CHEN Z, XU C, LENG X, CAO H, OUYANG G, XIAO W (2015) Repression of hypoxia-inducible factor α signaling by Set7-mediated methylation. *Nucleic Acids Res.* 43(10):5081-98.
- LIU ZJ, SHIRAKAWA T, LI Y, SOMA A, OKA M, DOTTO GP, FAIRMAN RM, VELAZQUEZ OC, HERLYN M (2003) REGULATION OF NOTCH1 AND DLL4 BY VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN ARTERIAL ENDOTHELIAL CELLS: IMPLICATIONS FOR MODULATING ARTERIOGENESIS AND ANGIOGENESIS. *MOL CELL BIOL.* 23(1): 14-25.
- LUGER K., MADER AW, RICHMOND RK, SARGENT DF, RICHMOND TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
- LUTOLF MP, GILBERT PM, BLAU HM (2009) Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature* 462(7272): 433–441.
- MA H, YANG Y, MA M. (2013) The Discovery of Stem Cell. *Stem Cell* 4(1):4-6.
- MA Q, KINTNER C, ANDERSON DJ (1996) Identification of neurogenin, a vertebrate neuronal determination gene. *Cell.* 4;87(1): 43-52.
- MA Q, YANG L, JIANG Z, SONG Q, XIAO M, ZHANG D, MA X, WEN T, CHENG G (2016) Three-Dimensional Stiff Graphene Scaffold on Neural Stem Cells Behavior. *ACS Appl Mater Interfaces.* 8(50): 34227-34233.
- MACDONALD JL, ROSKAMS AJ (2008) Histone deacetylases 1 and 2 are expressed at distinct stages of neuro-glial development. *Dev Dyn.* 237(8): 2256-2267.
- MACHALIŃSKI B, GABRIEL A, HONCZARENKO M, RATAJCZAK MZ (1998) Toxicity of Pyronin Y against human cord blood and bone marrow hematopoietic progenitor cells. Preliminary report. *Acta Haematol Pol.* 29:319–326.
- MACHOLD R, HAYASHI S, RUTLIN M, MUZUMDAR MD, NERY S, CORBIN JG, GRITLI-LINDE A, DELLOVADE T, PORTER JA, RUBIN LL, DUDEK H, MCMAHON AP, FISHELL G (2003) Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron.* 39(6): 937-950.
- MAHLA RS (2016) Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics. *Int J Cell Biol.* 2016:6940283.
- MAJUMDER A, DHARA SK, SWETENBURG R, MITHANI M, CAO K, MEDRZYCKI M, FAN Y, STICE SL (2013) Inhibition of DNA methyltransferases and histone deacetylases induces astrocytic differentiation of neural progenitors. *Stem Cell Res.* 11(1): 574-586.

- MASOUD GN, LI W (2015) HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 5(5):378-89.
- MAZZINI L, GELATI M, PROFICO DC, SGARAVIZZI G, PROJETTI PENSI M, MUZI G, RICCIOLINI C, ROTA NODARI L, CARLETTI S, GIORGI C, SPERA C, DOMENICO F, BERSANO E, PETRUZZELLI F, CISARI C, MAGLIONE A, SARNELLI MF, STECCO A, QUERIN G, MASIERO S, CANTELLO R, FERRARI D, ZALFA C, BINDA E, VISIOLI A, TROMBETTA D, NOVELLI A, TORRES B, BERNARDINI L, CARRIERO A, PRANDI P, SERVO S, CERINO A, CIMA V, GAIANI A, NASUELLI N, MASSARA M, GLASS J, SORARÙ G, BOULIS NM, VESCOVI AL (2015) Human neural stem cell transplantation in ALS: initial results from a phase I trial. *J Transl Med*. 27:13-17.
- MILOSEVIC J, ADLER I, MANAENKO A, SCHWARZ SC, WALKINSHAW G, AREND M, FLIPPIN LA, STORCH A, SCHWARZ J (2009) Non-hypoxic stabilization of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-alpha): relevance in neural progenitor/stem cells. *Neurotox Res*. 15(4): 367-380.
- MINUCCI S, PELICCI PG (2006) Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer*. 6(1): 38-51.
- MOHAMED ARIFF I, MITRA A, BASU A (2012) Epigenetic regulation of self-renewal and fate determination in neural stem cells. *J Neurosci Res*. 90, 529-539.
- MOLOFSKY AV, PARDAL R, MORRISON SJ (2004) Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol*. 16(6): 700-707.
- MOON BS, YOON JY, KIM MY, LEE SH, CHOI T, CHOI KY (2009) Bone morphogenetic protein 4 stimulates neuronal differentiation of neuronal stem cells through the ERK pathway. *Exp Mol Med*. 41:116–125
- MORRISS GM, NEW DA (1979) Effect of oxygen concentration on morphogenesis of cranial neural folds and neural crest in cultured rat embryos. *J Embryol Exp Morphol*. 54: 17-35.
- MORRISON SJ, PEREZ SE, QIAO Z, VERDI JM, HICKS C, WEINMASTER G, ANDERSON DJ (2000) Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell*. 101(5): 499-510.
- MUKHERJEE T, KIM WS, MANDAL L, BANERJEE U (2011) Interaction between Notch and Hif-alpha in development and survival of *Drosophila* blood cells. 332(6034): 1210-1213.
- NAMIHIRA M, KOHYAMA J, SEMI K, SANOSAKA T, DENEEN B, TAGA T, NAKASHIMA K (2009) Committed neuronal precursors confer astrocytic potential on residual neural precursor cells. *Dev Cell*. 16(2): 245-255.

- NAN X, NG HH, JOHNSON CA, LAHERTY CD, TURNER BM, EISENMAN RN, BIRD A (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386-389.
- NEW M, OLZSCHA H, LA THANGUE NB (2012) HDAC inhibitor-based therapies: can we interpret the code? *Mol Oncol.* 6, 637-656.
- NICHOL JW, KHADEMOSSEINI A (2009) Modular Tissue Engineering: Engineering Biological Tissues from the Bottom Up. *Soft Matter.* 5(7): 1312-1319.
- NOGUCHI H, KIMURA A, MURAO N, MATSUDA T, NAMIHIRA M, NAKASHIMA K (2015) Expression of DNMT1 in neural stem/precursor cells is critical for survival of newly generated neurons in the adult hippocampus. *Neurosci Res.* 95:1-11.
- O'NEILL LP, TURNER BM (1995) Histone H4 acetylation distinguishes coding regions of the human genome from heterochromatin in a differentiation-dependent but transcription-independent manner. *EMBO J.* 14, 3946-3957.
- OH YS, JEONG SG, CHO GW (2015) Anti-senescence effects of DNA methyltransferase inhibitor RG108 in human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biotechnol Appl Biochem.* 62(5): 583-590.
- OKAZAKI K, MALTEPE E (2006) Oxygen, epigenetics and stem cell fate. *Regen. Med.* 1: 71–83.
- PANCHISION DM (2009) The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. *J Cell Physiol.* 220(3): 562-568.
- PARK HS, HWANG I, CHOI KA, JEONG H, LEE JY, HONG S(2015) Generation of induced pluripotent stem cells without genetic defects by small molecules. *Biomaterials.* 39: 47-58.
- PAWAR K, MUELLER R, CAIONI M, PRANG P, BOGDAHN U, KUNZ W, WEIDNER N (2011) Increasing capillary diameter and the incorporation of gelatin enhance axon outgrowth in alginate-based anisotropic hydrogels. *Acta Biomater.*7(7): 2826-2834.
- PETRUZZELLI R, CHRISTENSEN DR, PARRY KL, SANCHEZ-ELSNER T, HOUGHTON FD (2014) HIF-2 α regulates NANOG expression in human embryonic stem cells following hypoxia and reoxygenation through the interaction with an Oct-Sox cis regulatory element. *PLoS One.* 9(10): e108309.
- PIETRUCHA K (2015) Physicochemical properties of 3D collagen-CS scaffolds for potential use in neural tissue engineering. *Int J Biol Macromol* 80: 732-739.

- PIETRUCHA K, ZYCHOWICZ M, PODOBINSKA M, BUZANSKA L (2017) Functional properties of different collagen scaffolds to create a biomimetic niche for neurally committed human induced pluripotent stem cells (iPSC). *Folia Neuropathol.* 55(2):110-123
- PISTOLLATO F, CHEN HL, SCHWARTZ PH, BASSO G, PANCHISION DM (2007) Oxygen tension controls the expansion of human CNS precursors and the generation of astrocytes and oligodendrocytes. *Mol Cell Neurosci.* 35(3): 424-435.
- PODOBINSKA M, SZABLOWSKA-GADOMSKA I, AUGUSTYNIAK J, SANDVIG I, SANDVIG A, BUZANSKA L (2017) Epigenetic Modulation of Stem Cells in Neurodevelopment: The Role of Methylation and Acetylation. *Front Cell Neurosci* 7;11:23.
- QIAO Y, WANG R, YANG X, TANG K, JING N (2015) Dual roles of histone H3 lysine 9 acetylation in human embryonic stem cell pluripotency and neural differentiation. *J Biol Chem.* 290, 2508-2520.
- QU Q, SUN G, MURAI K, YE P, LI W, ASUELIME G, CHEUNG YT, SHI Y (2013) Wnt7a regulates multiple steps of neurogenesis. *Mol Cell Biol.* 33(13):2551-9.
- RAO SS, WINTER JO (2009) Adhesion molecule-modified biomaterials for neural tissue engineering. *Front Neuroeng.* 9; 2:6.
- RHYU MS, JAN LY, JAN YN (1994) Asymmetric distribution of numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell.* 76(3): 477-491.
- RIVERS LE, YOUNG KM, RIZZI M, JAMEN F, PSACHOULIA K, WADE A, KESSARIS N, RICHARDSON WD (2008) PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci.* 11(12): 1392-1401.
- ROSZEK K, KOMOSZYŃSKI M (2008) Kontrola i kierunki różnicowania komórek macierzystych krwi pępowinowej oraz ich zastosowanie terapeutyczne. *Postepy Hig Med Dosw.* 62: 660-667.
- ROTHBART SB, STRAHL BD (2014) Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim Biophys Acta.* 1839, 627-643.
- RUGGIERI M, RIBOLDI G, BRAJKOVIC S, BUCCHIA M, BRESOLIN N, COMI GP, CORTI S. (2014) Induced neural stem cells: methods of reprogramming and potential therapeutic applications. *Prog Neurobiol.* 114: 15-24.
- SAHA K, POLLOCK JF, SCHAFFER DV, HEALY KE (2007) Designing synthetic materials to control stem cell phenotype. *Curr Opin Chem Biol.* 11(4): 381-387.

- SANTILLI G, LAMORTE G, CARLESSI L, FERRARI D, ROTA NODARI L, BINDA E, DELIA D, VESCOVI AL, DE FILIPPIS L (2010) Mild hypoxia enhances proliferation and multipotency of human neural stem cells. *PLoS One*. 5(1): e8575.
- SANDVIG I, GADJANSKI I, VLASKI-LAFARGE M, BUZANSKA L, LONCARIC D, SARNOWSKA A, RODRIGUEZ L, SANDVIG A, IVANOVIC Z (2017) Strategies to Enhance Implantation and Survival of Stem Cells After Their Injection in Ischemic Neural Tissue. *Stem Cells Dev*. 26(8):554-565.
- SARNOWSKA A, JABLONSKA A, JURGA M, DAINIAK M, STROJEK L, DRELA K, WRIGHT K, TRIPATHI A, KUMAR A, JUNGVID H, LUKOMSKA B, FORRAZ N, MCGUCKIN C, DOMANSKA-JANIK K. (2013) Encapsulation of mesenchymal stem cells by bioscaffolds protects cell survival and attenuates neuroinflammatory reaction in injured brain tissue after transplantation. *Cell Transplant*. 22 Suppl 1:S67-82.
- SCADDEN DT (2006) The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 441(7097): 1075-1079.
- SCHOFIELD R (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 4(1-2): 7-25.
- SEMENZA GL, NEJFELT MK, CHI SM, ANTONARAKIS SE (1991) Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(13):5680-5684.
- SEMENZA GL (2004) Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)*. 19: 176-182.
- SIEBZEHRUBL FA, BUSLEI R, EYUPOGLU IY, SEUFERT S, HAHNEN E, BLUMCKE I (2007) Histone deacetylase inhibitors increase neuronal differentiation in adult forebrain precursor cells. *Exp Brain Res* 176(4):672-678.
- SIERPINSKI P, GARRETT J, MA J, APEL P, KLORIG D, SMITH T, KOMAN LA, ATALA A, VAN DYKE M (2008) The use of keratin biomaterials derived from human hair for the promotion of rapid regeneration of peripheral nerves. *Biomaterials* 29(1): 118-128.
- SILVÁN U, DÍEZ-TORRE A, ARLUZZA J, ANDRADE R, SILIÓ M, ARÉCHAGA J (2009) Hypoxia and pluripotency in embryonic and embryonal carcinoma stem cell biology. *Differentiation*. 78(2-3): 159-168.
- SIMON MC, KEITH B (2008) The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9(4): 285-296.

- SIMS JR, LEE SW, TOPALKARA K, QIU J, XU J, ZHOU Z, MOSKOWITZ MA (2009) Sonic hedgehog regulates ischemia/hypoxia-induced neural progenitor proliferation. *Stroke*.40(11): 3618-3626.
- SMITH WC, HARLAND RM (1992) Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell*. 70: 829–840.
- SMITH WC, KNECHT AK, WU M, HARLAND RM (1993) Secreted noggin protein mimics the Spemann organizer in dorsalizing *Xenopus* mesoderm. *Nature*. 361: 547–549.
- SONG MR, GHOSH A (2004) FGF2-induced chromatin remodeling regulates CNTF-mediated gene expression and astrocyte differentiation. *Nat Neurosci*. 7(3): 229-235.
- SPANNA EP, DOE CQ (1996) Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates. *Neuron*. 17(1): 21-26.
- STĘPIEŃ-WYROBIEC O, HRYCEK A, WYROBIEC G (2008) Transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-beta) – budowa, mechanizmy oddziaływania oraz jego rola w patogenezie toczenia rumieniowatego układowego. *Postepy Hig Med Dosw*. 62: 688-693.
- STORCH A, PAUL G, CSETE M, BOEHM BO, CARVEY PM, KUPSCH A, SCHWARZ J (2001) Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells. *Exp Neurol*. 170(2): 317-325.
- STUDER L, CSETE M, LEE SH, KABBANI N, WALIKONIS J, WOLD B, MCKAY R (2000) Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci*. 20(19): 7377-7383.
- SUN X, VOLOBOUEVA LA, STARY CM, GIFFARD RG (2015) Physiologically normal 5% O₂ supports neuronal differentiation and resistance to inflammatory injury in neural stem cell cultures. *J Neurosci Res*. 93(11): 1703-1712.
- SUN Y, NADAL-VICENS M, MISONO S, LIN MZ, ZUBIAGA A, HUA X, FAN G, GREENBERG ME (2001) Neurogenin promotes neurogenesis and inhibits glial differentiation by independent mechanisms. *Cell*. 104(3): 365-376.
- SZABLOWSKA-GADOMSKA I, ZAYAT V, BUZANSKA L (2011) Influence of low oxygen tensions on expression of pluripotency genes in stem cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 71(1):86-93
- SZABLOWSKA-GADOMSKA I, SYPECKA J, ZAYAT V, PODOBINSKA M, PASTWINSKA A, PIENKOWSKA-GRELA B, BUZANSKA L (2012) Treatment with small molecules is an important milestone towards the induction of pluripotency in neural stem cells derived from human cord blood. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 72(4): 337-350.

- TAHILIANI M, KOH KP, SHEN Y, PASTOR WA, BANDUKWALA H, BRUDNO Y, AGARWAL S, IYER LM, LIU DR, ARAVIND L, RAO A (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324, 930-935.
- TAKIZAWA T, NAKASHIMA K, NAMIHIRA M, OCHIAI W, UEMURA A, YANAGISAWA M, FUJITA N, NAKAO M, TAGA T (2001) DNA methylation is a critical cell-intrinsic determinant of astrocyte differentiation in the fetal brain. *Dev Cell*. 1(6): 749-758.
- TEPEREK-TKACZ M, PASQUE V, GENTSCH G, FERGUSON-SMITH AC. (2011) Epigenetic reprogramming: is deamination key to active DNA demethylation? *Reproduction*. 142, 621-632.
- THEUS MH, WEI L, CUI L, FRANCIS K, HU X, KEOGH C, YU SP (2008) *In vitro* hypoxic preconditioning of embryonic stem cells as a strategy of promoting cell survival and functional benefits after transplantation into the ischemic rat brain. *Exp Neurol*. 210(2): 656-670.
- TOMIOKA T, MARUOKA H, KAWA H, YAMAZOE R, FUJIKI D, SHIMOKE K, IKEUCHI T (2014) The histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces neurite outgrowth in PC12 cells via the epigenetically regulated expression of the *nur77* gene. *Neurosci Res*. 88: 39-48.
- TSUTSUI H, VALAMEHR B, HINDOYAN A, QIAO R, DING X, GUO S, WITTE ON, LIU X, HO CM, WU H (2011) An optimized small molecule inhibitor cocktail supports long-term maintenance of human embryonic stem cells. *Nat Commun*. 2: 167.
- TUREK-PLEWA J, JAGODZIŃSKI PP (2005) The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett*.10(4): 631-647.
- TURNER BM (2007) Defining an epigenetic code. *Nat Cell Biol*. 9(1): 2-6.
- UEDA Y, OKANO M, WILLIAMS C, CHEN T, GEORGOPOULOS K, LI E (2006) Roles for *Dnmt3b* in mammalian development: a mouse model for the ICF syndrome. *Development* 133(6): 1183-1192.
- VASCONCELOS A, CAVACO-PAULO A (2013) The use of keratin in biomedical applications. *Curr Drug Targets*. 14(5): 612-619.
- VEEMAN MT, AXELROD JD, MOON RT (2003) A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell*. 5(3): 367-377.
- WADDINGTON CH (1942) The epigenotype. *Endeavour* 1, 18–20.
- WALSH CP, CHAILLET JR, BESTOR TH (1998) Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet*. 20, 116-117.

WANG GL, JIANG BH, RUE EA, SEMENZA GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(12): 5510-5514.

WANG RN, GREEN J, WANG Z, DENG Y, QIAO M, PEABODY M, ZHANG Q, YE J, YAN Z, DENDULURI S, IDOWU O, LI M, SHEN C, HU A, HAYDON RC, KANG R, MOK J, LEE MJ, LUU HL, SHI LL (2014) Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis*. 1(1): 87-105.

WILKINS SE, ABBOUD MI, HANCOCK RL, SCHOFIELD CJ (2016) Targeting Protein-Protein Interactions in the HIF System. *ChemMedChem*. 11(8): 773-786.

WILLERTH SM, SAKIYAMA-ELBERT SE (2007) Approaches to neural tissue engineering using scaffolds for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 59(4-5): 3253-38.

WU H, COSKUN V, TAO J, XIE W, GE W, YOSHIKAWA K, LI E, ZHANG Y, SUN YE (2010) Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes. *Science* 329, 444-448. doi: 10.1126/science.1190485.

WU SC, ZHANG Y (2010) Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11, 607-620.

WU Z, HUANG K, YU J, LE T, NAMIHIRA M, LIU Y, ZHANG J, XUE Z, CHENG L, FAN G (2012) Dnmt3a regulates both proliferation and differentiation of mouse neural stem cells. *J Neurosci Res*. 90(10):1883-1891.

YU Y, ZHOU Y, CHENG T, LU X, YU K, ZHOU Y, HONG J, CHEN Y (2016) Hypoxia enhances tenocyte differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells by inducing hypoxia-inducible factor-1 α in a co-culture system. *Cell Prolif*. 49(2):173-84.

YUAN Y, ZHANG P, YANG Y, WANG X, GU X (2004) The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro. *Biomaterials*. 25(18): 4273-4278.

ZHANG Y, LI W, LAURENT T, DING S (2012) Small molecules, big roles - the chemical manipulation of stem cell fate and somatic cell reprogramming. *J Cell Sci*. 125(Pt 23): 5609-5620.

ZHAO T1, ZHANG CP, LIU ZH, WU LY, HUANG X, WU HT, XIONG L, WANG X, WANG XM, ZHU LL, FAN M (2008) Hypoxia-driven proliferation of embryonic neural stem/progenitor cells-role of hypoxia-inducible transcription factor-1 α . *FEBS J*. 275(8): 1824-1834.

- ZHAO Y, MATSUO-TAKASAKI M, TSUBOI I, KIMURA K, SALAZAR GT, YAMASHITA T, OHNEDA O (2014) Dual Functions of Hypoxia-Inducible Factor 1 Alpha for the Commitment of Mouse Embryonic Stem Cells Toward a Neural Lineage. *Stem Cells Dev.* 23(18): 2143-2155.
- ZHOU FC (2012) DNA METHYLATION PROGRAM DURING DEVELOPMENT. *FRONT BIOL (BEIJING)*. 7(6): 485-494.
- ZHOU Q, DALGARD CL, WYNDER C, AND DOUGHTY ML (2011). Histone deacetylase inhibitors SAHA and sodium butyrate block G1-to-S cell cycle progression in Neurosphere formation by adult Subventricular cells. *BMC Neurosci.* 12:50.
- ZHU LL, WU LY, YEW DT, FAN M (2005) Effects of hypoxia on the proliferation and differentiation of NSCs. *Mol Neurobiol.* 31(1-3):231-242.
- ZYCHOWICZ M, MEHN D, RUIZ A, FRONTZAK-BANIEWICZ M, ROSSI F, BUZANSKA L (2012) Patterning of human cord blood-derived stem cells on single cell posts and lines: Implications for neural commitment. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 72(4): 325-336.
- ZYCHOWICZ M, MEHN D, RUIZ A, COLPO P, ROSSI F, FRONTZAK-BANIEWICZ M, DOMANSKA-JANIK K, BUZANSKA L (2011) Proliferation capacity of cord blood derived neural stem cell line on different micro-scale biofunctional domains. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 71(1): 12-23.
- ZYLICZ JJ, DIETMANN S, GÜNESDOĞAN U, HACKETT JA, COUGOT D, LEE C, SURANI MA (2015) Chromatin dynamics and the role of G9a in gene regulation and enhancer silencing during early mouse development. *Elife.* 9;4. pii: e09571.