

Mgr inż. Sylwia Dąbrowska

Analiza właściwości immunomodulacyjnych
ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego
i pochodzących z nich zewnątrzkomórkowych pęcherzyków
przeszczepianych w modelu cytotoksycznego uszkodzenia mózgu u szczura

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

Promotor: prof. dr hab. Barbara Łukomska



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

Warszawa 2018

Wyniki zamieszczone w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały opublikowane bądź są przedmiotem recenzji w czasopiśmie, do którego zostały przesłane w postaci manuskryptu pracy oryginalnej:

- **Koniusz S**, Andrzejewska A, Janowski M, Muraca M, Lukomska B: Extracellular vesicles in physiology, pathology and therapy of central nervous system in the context of their mesenchymal stem cell origin. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2016 May 2;10:109
IF=4.609
- **Dabrowska S**, Del Fattore A, Karnas E, Frontczak-Baniewicz, Kozłowska H, Muraca M, Janowski M, Lukomska B: Imaging of extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stromal cells using fluorescent and magnetic labels. *Int J Nanomedicine* 2018;13:1653-1664
IF=4.370
- **Dabrowska S**, Andrzejewska A, Strzemecki D, Muraca M, Janowski M, Lukomska B: Human mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles ameliorate inflammation-induced with ischemic brain injury in rats. *Journal of Neuroinflammation* (wysłane do publikacji, w recenzjach)
IF=5.193

a także zgłoszenia patentowego:

- Nr P. 425 406 pt: „Zastosowanie mikropęcherzyków pochodzących z komórek macierzystych w leczeniu stanu zapalnego mózgu, zwłaszcza wywołanego udarem” (z dnia 27.04.2018r)

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

- MNiSW KNOW 06 (2013-2017)
- NCBiR STRATEGMED I “EXPLORE ME” (2016-2018)

*Pragnę serdecznie podziękować Pani Profesor dr hab. Barbarze Łukomskiej
za umożliwienie mi rozwoju naukowego, wiele cennych uwag, życzliwość
oraz opiekę podczas prowadzenia badań i pisania niniejszej rozprawy*

*Chciałabym również podziękować moim Koleżankom i Kolegom
oraz wszystkim Pracownikom Zakładu Neurobiologii Naprawczej
za okazaną pomoc i stworzenie wyjątkowej atmosferydo pracy w Zespole*

*Dziękuję mojej Rodzinie, w szczególności Mężowi, Rodzicom i Babci
za wsparcie, wiarę we mnie i cierpliwość*

Spis treści

Spis treści	4
Wykaz skrótów	6
Streszczenie pracy doktorskiej	10
Abstract	13
Innowacyjność rozprawy doktorskiej	15
1. Przegląd piśmiennictwa	16
1.1. Niedokrwienie mózgu	16
1.2. Reakcje „zapalne” towarzyszące procesom ischemii mózgu	17
1.2.1. Lokalne reakcje komórkowe towarzyszące ischemii mózgu	17
1.2.2. Mediatorzy reakcji zapalnych	20
1.3. Mezenchymalne komórki macierzyste	23
1.3.1. Odkrycie i źródła mezenchymalnych komórek macierzystych	23
1.3.2. Charakterystyka mezenchymalnych komórek macierzystych	24
1.3.3. Właściwości i mechanizm działania MSCs	26
1.3.4. Funkcje biologiczne MSCs	27
1.3.5. Funkcje immunomodulacyjne MSCs	29
1.4. Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki	31
1.4.1. Rodzaje zewnątrzkomórkowych pęcherzyków	32
1.4.2. Skład EVs	33
1.4.3. Mechanizmy wychwyty EVs przez komórki	35
1.4.4. Biologiczne funkcje EVs	35
1.4.5. Immunomodulacyjne funkcje EVs	37
1.5. Próby terapii eksperymentalnej w ischemii mózgu z zastosowaniem MSCs i EVs	39
1.5.1. Zastosowanie MSCs w terapii ischemii mózgu	39
1.5.2. Zastosowanie EVs w terapii ischemii mózgu	42
1.6. Próby terapii klinicznej w ischemii mózgu z zastosowaniem MSCs	44
2. Założenia i cel pracy	48
3. Materiał	50
3.1. Ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego	50
3.2. Zwierzęta doświadczalne	50
3.3. Grupy doświadczalne	50
4. Metody badań	51
4.1. Hodowla komórek hBM-MSCs	51
4.2. Znakowanie komórek hBM-MSCs za pomocą Molday ION	51
4.3. Znakowanie komórek hBM-MSCs za pomocą PKH26	51
4.4. Izolacja zewnątrzkomórkowych pęcherzyków (EVs) uwalnianych z hBM-MSCs podczas hodowli komórek <i>in vitro</i>	51
4.5. Analiza zewnątrzkomórkowych pęcherzyków wyizolowanych z mezenchymalnych komórek macierzystych za pomocą aparatury NanoSight	52
4.6. Znakowanie EVs za pomocą PKH26	52
4.7. Analiza hBM-MSCs i EVs <i>in vitro</i> w transmisyjnym mikroskopie elektronowym	52
4.8. Analiza EVs w rezonansie magnetycznym	52
4.9. Analiza EVs za pomocą wysokorozdzielczej cytometrii przepływowej	53
4.10. Analiza EVs i hBM-MSCs przy pomocy metody Western Blot	53
4.11. Współhodowle EVs i hBM-MSCs	54
4.12. Analiza immunocytochemiczna	54
4.13. Model uszkodzenia prądkowia szczura ouabainą	54
4.15. Analiza przeszczepionych hBM-MSCs w MRI w czasie rzeczywistym	56
4.16. Pobieranie materiału do badań	56
4.17. Analiza immunohistochemiczna	56
4.18. Homogenizacja mózgow szczurzych i pomiar ilości białka	57

4.19. Analiza poziomu cytokin i chemokin w homogenatach mózgu szczurów za pomocą aparatu Luminex	57
4.20. Analiza statystyczna.....	58
5. Wyniki.....	60
5.1. Ocena morfologiczna i fenotypowa komórek hBM-MSCs <i>in vitro</i>	60
5.2. Analiza wewnątrzkomórkowych struktur w hBM-MSCs z zastosowaniem SR-SIM i TEM.....	61
5.3. Ocena pęcherzyków wyizolowanych z hBM-MSCs przy pomocy TEM	62
5.4. Obrazowanie MR - EVs wyizolowanych z hBM-MSCs znakowanych Molday ION	63
5.5. Analiza liczby i wielkości EVs wyizolowanych z hBM-MSCs przy użyciu NanoSight	63
5.6. Ocena EVs po ich izolacji z hBM-MSCs za pomocą wysokorozdzielczej cytometrii przepływowej	64
5.7. Analiza EVs wyizolowanych z hBM-MSCs za pomocą Western blot	66
5.8. Współhodowle EVs z hBM-MSCs	66
5.9. Obrazowanie hBM-MSCs w mózgu szczurów w sekwencji czasowej po ich transplantacji (MRI)	67
5.10. Ocena immunohistochemiczna hBM-MSCs obecnych po ich przeszczepie w mózgu.....	68
5.11. Obecność EVs wyznakowanych PKH26 w mózgach szczurów po dotętnicznej transplantacji .	69
5.12. Analiza efektorów odpowiedzi immunologicznej w mózgu szczurów w poszczególnych grupach eksperymentalnych.....	70
5.13. Analiza mediatorów zapalnych w mózgach szczurów w poszczególnych grupach eksperymentalnych.....	78
6. Dyskusja.....	86
6.1. Analiza EVs wyizolowanych z MSCs	87
6.2. Ocena migracji i osiedlania się MSCs i EVs po przeszczepie dotętnicznym.....	89
6.3. Analiza komórek odpowiedzi immunologicznej w mózgu szczura po uszkodzeniu prądkowia i transplantacji hBM-MSCs lub EVs.....	91
6.4. Analiza mediatorów reakcji zapalnych w mózgu szczura po uszkodzeniu prądkowia i przeszczepie hBM-MSCs lub EVs.....	93
7. Podsumowanie	97
8. Wnioski	97
9. Spis piśmiennictwa	98

Wykaz skrótów

ACTA	- białko indukujące tworzenie aktyny (ang. actin assembly-inducing protein)
AD-MSCs	- mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej (ang. adipose-derived mesenchymal stem cells)
ALCAM	- cząsteczka aktywująca adhezję komórkową leukocytów (ang. activated leukocyte cell adhesion molecule)
AMPA	- kwas α -amino-3-hydroksy-5-metylo-4-izoksazolopropionowy (ang. α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)
ap2	- białka adipocytów 2 (ang. adipocyte protein 2)
APC	- komórki prezentujące antygen (ang. antigen-presenting cell)
ATP	- adenzyno-5'-trifosforan (ang. adenosine triphosphate)
BDNF	- neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. brain-derived neurotrophic factor)
bFGF	- zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. basic fibroblast growth factor)
BME	- β -merkaptoetanol (ang. β -mercaptoethanol)
BM-MNCs	- komórki jednojądrzaste pochodzące ze szpiku kostnego (ang. bone marrow mononuclear cells)
BM-MSCs	- mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego (ang. bone marrow mesenchymal stem cells)
BMPs	- białka morfogenetyczne kości (ang. bone morphogenetic proteins)
BrdU	- 5-bromo-2'-deoksyurydyna (ang. 5-bromo-2'-deoxyuridine)
BSA	- albumina surowicy bydłowej (ang. bovine serum albumin)
CCL	- ligand chemokiny grupy CC(β) (ang. chemokine (C-C motif) ligand)
CDC42	- białko kontroli podziału komórek 42 (ang. cell division control protein 42)
CFDA	- znacznik fluorescencyjny (ang. 5(6)-carboxyfluorescein diacetate)
CFSE	- znacznik fluorescencyjny (ang. carboxyfluorescein succinimidyl ester)
CNP	- peptyd natriuretyczny typu C (ang. C-type natriuretic peptide)
COX-2	- cyklooksygenaza indukowana (ang. cyclooxygenase-2)
CX3CL	- ligand chemokiny grupy CX3C (ang. chemokine (C-X3-C motif) ligand)
CXCL	- ligand chemokiny grupy CXC (ang. chemokine (C-X-C motif) ligand)
CX3CLR	- receptor chemokiny grupy CX3C (ang. (C-X3-C) motif chemokine receptor)
CXCR	- receptor chemokiny grupy CXC (ang. C-X-C motif chemokine receptor)
DAMPs	- wzorce molekularne związane z uszkodzeniem (ang. damage-associated molecular pattern)
DCs	- komórki dendrytyczne (ang. dendritic cells)
DiD	- znacznik fluorescencyjny (ang. 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine, 4-chlorobenzenesulfonate salt)
Dil	- znacznik fluorescencyjny (ang. 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate)
DNA	- kwas deoksyrybonukleinowy (ang. deoxyribonucleic acid)
DPBS	- dejonizowany PBS
DRG	- zwoje rdzeniowe (ang. dorsal root ganglia)
E2R	- E2 represor (ang. E2 repressor)
ECM	- macierz zewnątrzkomórkowa (ang. extracellular matrix)
EEF1A1	- czynnik elongacyjny 1 alfa 1 (ang. elongation factor 1-alpha 1)
EGF	- epidermalny czynnik wzrostu (ang. epidermal growth factor)
EGF-R	-receptor dla epidermalnego czynnika wzrostu (ang. epidermal growth factor receptor)
EPO	- erytropoetyna (ang. erythropoietin)
ESC-MSCs	- mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z zarodkowych komórek macierzystych (ang. mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells)
EVs	- zewnątrzkomórkowe pęcherzyki (ang. extracellular vesicles)

FA	- kąt odchylenia (ang. flip angle)
FasL	- ligand Fas (ang. Fas ligand)
FBS	- bydlęca surowica płodowa (ang. fetal bovine serum)
FGF	- czynnik wzrostu fibroblastów (ang. fibroblast growth factor)
FITC	- izotiocyanian fluoresceiny (ang. fluorescein isothiocyanate)
FN1	- fibronektyna 1 (ang. fibronectin 1)
FSK	- forskolina (ang. forskolin)
GAPDH	- dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerynowego (ang. glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase)
GD2	- neuralny gangliozyd (ang. neural ganglioside)
GDNF	- glejopochodny czynnik neurotroficzny (ang. glial cell-derived neurotrophic factor)
GFAP	- glejowe kwaśne białko włókienkowe (ang. glial fibrillary acidic protein)
GFP	- białko zielonej fluorescencji (ang. green fluorescent protein)
GM-CSF	- czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (ang. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
GNA13	- białko wiążące nukleotyd guaniny podjednostka alfa 13 (ang. guanine nucleotide-binding protein subunit alpha-13)
GNG12	- białko wiążące nukleotyd guaniny podjednostka 12 (ang. guanine nucleotide binding protein subunit gamma 12)
GPCRs	- receptory sprzężone z białkami G (ang. G Protein-Coupled Receptors)
GRPs	- progenitory komórek glejowych (ang. glial-restricted precursor cells)
GS	- surowica kozia (ang. goat serum)
G-SCF	- czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (ang. granulocyte colony-stimulating factor)
GVHD	- choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi (ang. graft-versus-host disease)
hBM-MSCs	- ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego (ang. human bone marrow mesenchymal stem cells)
HGF	- czynnik wzrostu hepatocytów (ang. hepatocyte growth factor)
HLA	- ludzkie antygeny leukocytarne (ang. human leukocyte antigens)
HNF4α	- czynnik jądrowy hepatocytów 4 alfa (ang. hepatocyte nuclear factor 4 alpha)
HRG	- heregulina (ang. heregulin)
HSCs	- hematopoetyczne komórki macierzyste (ang. hemapoietic stem cells)
HSP	- białka szoku cieplnego (ang. heat shock proteins)
ICAM-1	- cząsteczka adhezji międzykomórkowej 1 (ang. intercellular adhesion molecule 1)
IDO	- 2,3-dioksygenaza indoloaminy (ang. indoleamine 2,3-dioxygenase)
IFNγ	- interferon γ (ang. interferon γ)
Ig	- immunoglobulina (ang. immunoglobulin)
IGF	- insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. insulin-like growth factor)
IGF-R	- receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu (ang. insulin-like growth factor 1 receptor)
IL	- interleukina (ang. interleukin)
IL-1Ra	- antagonista receptora interleukiny 1 (ang. interleukin-1 receptor antagonist)
iNOS	- indukowalna syntaza tlenu azotu (ang. inducible nitric oxide synthase)
IP-10/CXCL10	- białko 10 indukowane przez interferon / chemokiny CXC ligand 10 (ang. interferon gamma-induced protein 10 / C-X-C motif chemokine 10)
IRF4⁺	- 4 dodatni czynnik regulacyjny interferonu (ang. IFN regulatory factor 4- positive)
IQGAP1	- (ang. Ras GTPase-activating-like protein)
ITS	- insulina-transferyna-selen (ang. insulin-transferrin-selenium)
LFA-1	- antygen związany z funkcją leukocytów (ang. lymphocyte function-associated antigen 1)
LIF	- czynnik hamujący białaczkę (ang. leukemia inhibitory factor)
LSM	- skaningowa mikroskopia laserowa (ang. laser scanning microscopy)
M1	- komórki mikrogleju/makrofagi o fenotypie prozapalnym
M2	- komórki mikrogleju/makrofagi o fenotypie przeciwzapalnym

MAG	- glikoproteina związana z mieliną (ang. myelin-associated glycoprotein)
MALS	- odpowiada relatywnej wielkości analizowanych próbek (ang. middle angle light scatter)
MAPK1	- kinaza 1 aktywowana mitogenem (ang. mitogen-activated protein kinase 1)
MCP-1	- białko chemotaktyczne monocytów (ang. monocyte chemoattractant protein 1)
M-CSF	- czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (ang. macrophage colony-stimulating factor)
MIP	- białko zapalne makrofagów (ang. macrophage inflammatory protein)
miRNA	- mikroRNA (ang. microRNA)
MMPs	- metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. matrix metalloproteinases)
MOG	- glikoproteina oligodendrocytów (ang. myelin oligodendrocyte glycoprotein)
Molday ION	- superparamagnetyczne nanocząstki żelaza (SPIO) skoniugowane z rodaminą B (ang. superparamagnetic iron oxide (SPIO) particles conjugated with rhodamine B)
MRI	- obrazowanie przy użyciu rezonansu magnetycznego (ang. magnetic resonance imaging)
mRNA	- informacyjny/matrycowy RNA (ang. messenger RNA)
MSCs	- mezenchymalne komórki macierzyste (ang. mesenchymal stem cells)
MSCA-1	- antygen mezenchymalnych komórek macierzystych (ang. mesenchymal stem cell antigen)
MT	- mechaniczna trombektomia (ang. mechanical thrombectomy)
MVBs	- ciała wielopęcherzykowe (ang. multivesicular bodies)
MVs	- mikropęcherzyki (ang. microvesicles)
NCAM	- cząsteczka adhezji neuronów (ang. neural cell adhesion molecule)
NeuN	- białko jądrowe specyficzne dla dojrzałych neuronów (ang. neuronal nuclear antigen)
NGFβ	- czynnik wzrostu nerwów beta (ang. nerve growth factor)
NIHSS	- Skala udaru opracowana przez Narodowy Instytut Zdrowia (ang. the National Institutes of Health Stroke Scale)
NMDA	- kwas N-metylo-D-asparaginowy (ang. N-Methyl-D-aspartic acid)
NO	- tlenek azotu (ang. nitric oxide)
NOS	- syntaza tlenu azotu (ang. nitric oxide synthases)
NT-3	- neurotrofina-3 (ang. neurotrophin-3)
NTA	- analiza śledzenia ruchu nanocząstek (ang. nanoparticle tracking analysis)
OGD	- deprywacja tlenu i glukozy (ang. oxygen-glucose deprivation)
OUA	- ouabaina (ang. ouabain)
OUN	- ośrodkowy układ nerwowy
PBS	- buforowana sól fizjologiczna (ang. phosphate-buffered saline)
PDGF	- płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. platelet-derived growth factor)
PDGF-RB	- receptor dla płytkopochodnego czynnika wzrostu typu beta (ang. beta-type platelet-derived growth factor receptor)
PD-L1	- ligand receptora programowanej śmierci (ang. programmed death-ligand 1)
PE	- fikoerytryna (ang. phycoerythrin)
PEDF	- czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego siatkówki (ang. pigment epithelium-derived factor)
PFA	- paraformaldehyd (ang. paraformaldehyde)
PGE-2	- prostaglandyna E-2 (ang. prostaglandin E2)
PIGF	- łożyskowy czynnik wzrostu (ang. placental growth factor)
piRNA	- małe, niekodujące cząsteczki RNA (ang. piwi-interacting RNA)
PLAUR	- aktywator plazminogenu, receptor urokinazy (ang. plasminogen activator urokinase receptor)
PLP	- białko proteolipidowe (ang. proteolipid protein)
PMSF	- fluorek fenylometylosulfonylu (ang. phenylmethylsulfonyl fluoride)
PODXL	- białko podobne do podokaliksiny (ang. podocalyxin-like protein 1)
PPARγ	- receptor aktywowany proliferatorem peroksysomów γ (ang. peroxisome proliferator-activated receptor)

pre-miRNA	- prekursorowe miRNA (ang. precursor miRNA)
RA	- kwas retinowy (ang. retinoic acid)
RCTs	- badania randomizowane z kontrolą (ang. randomized controlled trials)
RGCs	- komórki zwojowe siatkówki (ang. retinal ganglion cells)
RNA	- kwas rybonukleinowy (ang. ribonucleic acid)
ROS	- reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species)
rRNA	- rybosomalne RNA (ang. ribosomal RNA)
RS	- bardzo małe komórki zdolne do gwałtownej samoodnowy (ang. rapidly self-renewing cells)
Sca-1	- antygen komórek macierzystych (ang. stem cells antigen)
SCF	- czynnik wzrostu komórek macierzystych (ang. stem cell factor)
SDF-1	- zrębowy czynnik wzrostu (ang. stromal cell-derived factor 1)
SDS-PAGE	- elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecylu sodu (ang. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
SEC	- chromatografia z wykluczeniem wielkości (ang. size exclusion chromatography)
SH	- domena homologii SRC (ang. SRC homology domain)
Sox1	- czynnik transkrypcyjny (ang. SRY (sex determining region Y) - box 1)
SPECT	- tomografia emisyjna pojedynczych fotonów (ang. single-photon emission computed tomography)
SPIO	- superparamagnetyczne nanocząstki żelaza (ang. superparamagnetic iron oxide)
SR-SIM	- mikroskopia superrozdzielcza typu SIM (ang. superresolution structured illumination microscopy)
SSEA	- specyficzny dla stadium antygen embrionalny (ang. stage-specific embryonic antigen)
STEPS	- Terapie komórkami macierzystymi w udarze (ang. Stem Cell Therapy as an Emerging Paradigm for Stroke)
SVZ	- strefa okołokomorowa (ang. subventricular zone)
TA	- czas pozyskiwania (ang. acquisition time)
TBST	- sól fizjologiczna buforowana TRIS (ang. TRIS-buffered saline)
Tc	- limfocyty T cytotoksyczne (ang. T cytotoxic cells)
TE	- czas echa (ang. echo time)
TEM	- transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. transmission electron microscopy)
TGFβ	- transformujący czynnik wzrostu β (ang. transforming growth factor β)
Th	- limfocyty T pomocnicze (ang. T helper cells)
Thy-1	- antygen tymocytarny 1 (ang. thymocyte antigen 1)
TIMP	- tkankowy inhibitor metaloproteinaz (ang. tissue inhibitor of metalloproteinase)
TNFα	- czynnik martwicy nowotworu α (ang. tumor necrosis factor)
TNTs	- nanorurki tunelujące (ang. tunneling nanotubes)
tPA	- tkankowy aktywator plazminogenu (ang. tissue plasminogen activator)
TR	- czas powtórzeń sekwencji (ang. repetition time)
T_{regs}	- limfocyty T regulatorowe (ang. regulatory T cells)
tRNA	- transportujące RNA (ang. transfer RNA)
TUB	- ang. tubby protein homolog
tx	- transplantacja
UCSCs	- mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze sznura pępowiny (ang. umbilical cord mesenchymal stem cells)
USPIO	- bardzo małe superparamagnetyczne nanocząstki żelaza (ang. ultrasmall superparamagnetic iron oxide)
VAV2	- współczynnik wymiany nukleotydu guaniny (ang. guanine nucleotide exchange factor)
VCAM-1	- cząsteczka adhezji komórkowej naczyń 1 (ang. vascular cell adhesion molecule 1)
VEGF	- czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (ang. vascular endothelial growth factor)
vWF	- czynnik von Willendrandt (ang. von Willebrand factor)

Streszczenie pracy doktorskiej

Niedokrwienie mózgu jest jednym z ważniejszych problemów klinicznych chorób ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Występujący w następstwie niedokrwienia zespół objawów określany mianem udaru powoduje wysoki wskaźnik śmiertelności chorych. Nagła śmierć komórek neuralnych w miejscu niedotlenienia i uwalnianie czynników związanych z uszkodzeniem tkanki stanowi istotę lokalnych reakcji immunologicznych w mózgu. Aktywacja astrocytów, komórek mikrogleju i napływ leukocytów z krwi przyczynia się do progresji schorzenia. Miejscowy „proces zapalny” wywołany zmianami w tkance powstałymi na skutek ischemii zwiększa obszar uszkodzenia.

Ograniczone możliwości terapii sprawiają, iż poszukiwanie nowych metod leczenia skutków udaru prowadzi się wielokierunkowo, wykorzystując różne elementy patofizjologii, w tym również modulację działania komórek immunologicznie czynnych gospodarza. Blokowanie szkodliwych efektów reakcji układu odpornościowego i promowanie korzystnych oddziaływań w procesach reparacji, zniszczonych w wyniku udaru struktur, wydaje się celowe w przyszłych strategiach terapeutycznych. W ostatnich latach dużym zainteresowaniem cieszą się mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs). Z badań eksperymentalnych wynika, że przeszczep MSCs powoduje pozytywny efekt w postaci stymulacji procesów naprawczych po urazie i modulacji odpowiedzi immunologicznej biorcy. To współdziałanie (*cross-talk*) pomiędzy MSCs dawcy i komórkami biorcy wydaje się niezwykle istotne dla prawidłowej homeostazy w OUN oraz przeżycia i zachowania funkcji pozostałych po uszkodzeniu neuronów. Stąd rozwój „immunomodulacyjnych strategii”, które będą kontrolowały funkcje poszczególnych populacji komórek immunologicznych w różnych fazach udaru, wydaje się obiecującym kierunkiem w terapii. Transfer mezenchymalnych komórek macierzystych, które wykazują silne właściwości immunomodulacyjne, może być jednym z nich.

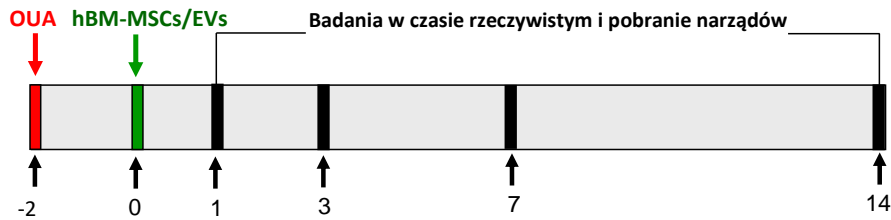
Z uwagi na silne właściwości parakryne, przeszczepione MSCs uwalniają w środowisku gospodarza szereg czynników troficznych, które uczestniczą w ograniczaniu procesów zapalnych, apoptozy i fibrozy uszkodzonych tkanek. Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały, że czynniki MSCs przekazywane są nie tylko w postaci uwolnionej, ale także za pośrednictwem zewnątrzkomórkowych pęcherzyków (EVs). Wydaje się, że EVs uwalniane z MSCs mogą spełniać takie same funkcje jak komórki, z których pochodzą. Z dotychczasowych badań wiadomo, że substancje przekazywane przez EVs do otaczających komórek mogą zmieniać ich los i właściwości. Będąc naturalnymi nośnikami substancji bioaktywnych, przeszczepione w warunkach ischemii EVs mogą re-programować endogenne komórki w uszkodzonej tkance, modulując ich funkcje oraz działać immunosupresyjnie, ograniczając odpowiedź prozapalną. Weryfikacja efektów działania EVs w badaniach przedklinicznych w porównaniu z przeszczepem MSCs jest konieczna, dlatego postanowiliśmy, że temat ten będzie przedmiotem moich badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej.

Celem badań była ocena właściwości immunomodulacyjnych ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego oraz wyizolowanych z nich zewnątrzkomórkowych pęcherzyków przeszczepianych u dorosłych szczurów w modelu cytotoksycznego uszkodzenia mózgu ouabainą.

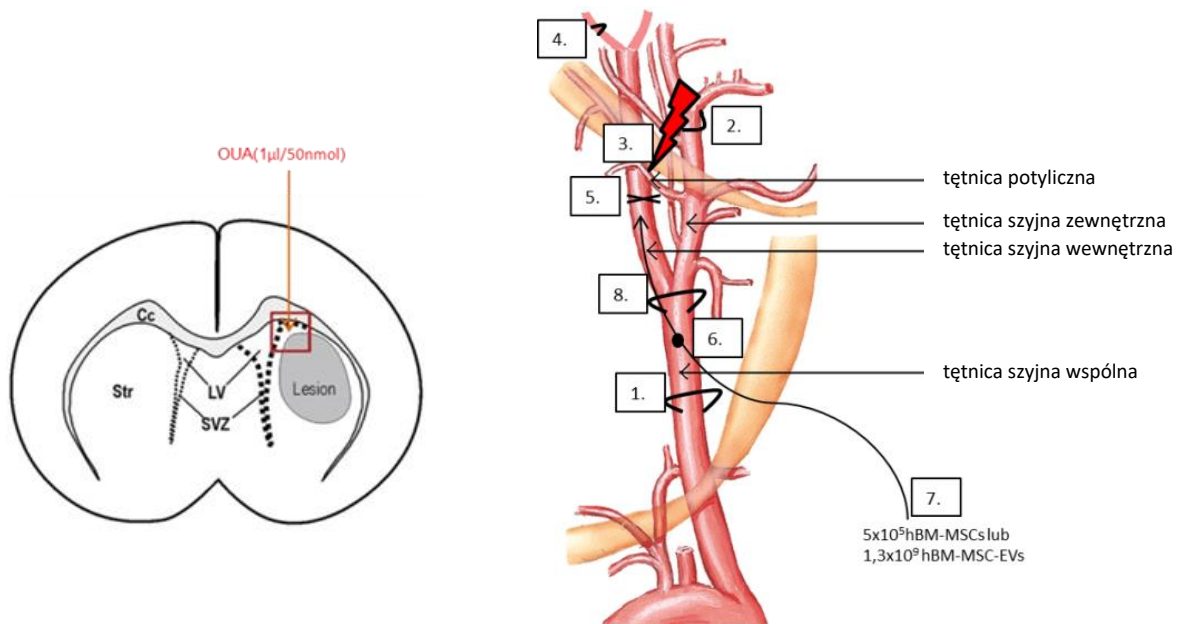
Przedmiotem badań były ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego (hBM-MSCs) komercyjnie dostępne firmy Lonza i izolowane z nich zewnątrzkomórkowe pęcherzyki (EVs), oceniane w eksperymentach *in vitro* i *in vivo* po ich transplantacji u szczurów.

Wybrany do badań model cytotoksycznego uszkodzenia mózgu z zastosowaniem inhibitora pompy sodowo-potasowej (ouabainy) został opracowany w naszym zespole. Szczegółowo opisane wcześniej ogniskowe uszkodzenie tkanki dotyczyło w różnym stopniu poszczególnych struktur prążkowiego.

Do badań *in vivo* wykorzystano dorosłe samce szczurów stada Wistar, w wieku około 3 miesięcy, o ciężarze ciała 250-280g, pochodzące z Charles River Sulzfeld, hodowane w Zwierzętarńi Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, przeprowadzając eksperymenty według następującego schematu:



Po 48 godzinach od podania do prążkowiego szczura ouabainy (OUA), przeszczepiano do prawej tętnicy szyjnej (tożsamej z półkulą, w której było uszkodzenie) hBM-MSCs lub EVs (zabiegi mikrochirurgiczne uszkodzenia prążkowiego i i.a. transplantacji uwidoczniono na schematach).



Cel pracy doktorskiej był realizowany w oparciu o badania dotyczące:

- opracowania metody izolacji EVs z hBM-MSCs, ich charakterystyki i wyboru techniki optymalnego znakowania w celu wizualizacji EVs w badaniach *in vitro* i *in vivo*
- określenia migracji hBM-MSCs i EVs podanych dotętniczo oraz możliwości zasiedlania przez nie rejonów mózgu biorców przeszczepu w modelu cytotoksycznego uszkodzenia mózgu
- oceny wrodzonej i adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej w mózgu szczura, poddanego wcześniej uszkodzeniu prążkowiego, po przeszczepie hBM-MSC i EVs

Do charakterystyki wyizolowanych EVs stosowano metodę NanoSight pozwalającą określić ich liczbę i wielkość. Obecność antygenów analizowano za pomocą wysokorozdzielczej cytometrii przepływowej, Western Blot i badań immunocytochemicznych, wyznakowanie EVs nanocząstkami żelaza oceniano w mikroskopie elektronowym, konfokalnym i MRI.

Przeszczepione dotętniczo hBM-MSCs lub EVs były oceniane w mózgu biorców w czasie rzeczywistym w badaniach MRI tuż po ich podaniu, a także po 1, 3, 7 i 14 dniach od transplantacji. W tych samych sekwencjach czasowych pobierano od zwierząt eksperymentalnych mózgi, gdzie w skrawkach mrożonych przeprowadzano badania immunohistochemiczne komórek dawcy i komórek immunologicznie czynnych biorcy oraz oceniano poziom cytokin i chemokin za pomocą zestawów BioPlexPro techniką Luminex.

Otrzymane przez nas wyniki pozwalają podsumować badania i sformułować następujące wnioski:

- Opracowano metodę izolacji zewnątrzkomórkowych pęcherzyków (EVs) z ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego (hBM-MSCs) i ich znakowania PKH26 lub nanocząstkami żelaza skoniugowanymi z rodaminą (Molday ION), umożliwiającymi wizualizację zarówno *in vitro* jak i *in vivo*
 - Wykazano, iż znakowanie zewnątrzkomórkowych pęcherzyków PKH26 lub Molday ION nie ogranicza ich migracji obserwowanej zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*
 - Badane komórki hBM-MSCs lub pochodzące z nich zewnątrzkomórkowe pęcherzyki podawane do prawej tętnicy szyjnej szczura lokalizują się w mózgu biorcy w okolicy wywołanego wcześniej uszkodzenia
 - Po transplantacji hBM-MSCs lub EVs obserwowano zmniejszenie aktywacji komórek mikrogleju oraz liczby leukocytów, w tym limfocytów T CD8⁺ w mózgu zwierząt, których wzrost był spowodowany cytotoksycznym uszkodzeniem prądkowia
 - Analiza cytokin oraz chemokin w mózgu szczurów wykazała, że przeszczep hBM-MSCs lub EVs powodował obniżenie poziomu cytokin prozapalnych: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ i TGF- β 2 oraz chemokin: CXCL1, MIP-1 α , MIP-3 α i MCP-1, których zwiększenie obserwowano w wyniku cytotoksycznego uszkodzenia mózgu
- (i) Opracowana przez nas metoda izolacji zewnątrzkomórkowych pęcherzyków z ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego umożliwiła otrzymanie czystej populacji EVs, pozbawionej *debris* komórkowego
- (ii) Zmodyfikowana technika dotętnicznej transplantacji pozwoliła na bezpośredni transfer podawanych komórek i zewnątrzkomórkowych pęcherzyków do półkuli mózgu tożsamej z miejscem uszkodzenia
- (iii) Przeszczepiane dotętniczo zewnątrzkomórkowe pęcherzyki mają zdolność immunomodulacyjnego działania na komórki mózgu gospodarza porównywalną z efektem komórek mezenchymalnych, z których zostały wyizolowane
- (iiii) Wydaje się, iż systemowa transplantacja zewnątrzkomórkowych pęcherzyków może być bardziej bezpieczna niż przeszczep komórek ze względu na mniejszy rozmiar EVs i słabą immunogenność związaną z brakiem lub niską ekspresją antygenów

Abstract

The regenerative medicine therapy in order to reconstruct damaged structures of central nervous system (CNS) is the subject of interest of medical and scientific environment. Despite the existence of neural stem cells adult CNS has limited ability for self-renewal, especially in pathological conditions. The transplantation of stem cells is the new way of therapy for supporting reconstructive processes in the damage region of CNS.

Mesenchymal stem cells (MSCs) have recently emerged as promising candidates for cell-based therapy in neurological disorders. Based on differentiation potential of MSCs initially studies focused on the regenerative capacity of these cells. The mechanisms of action used by MSCs i.e. immunomodulation, cell protection, pre-reparation and stimulation of angiogenesis have been elucidated *in vitro* but the data from pre-clinical studies have been unclear. Accumulating evidence over the past few years supports the notion that the predominant mechanism by which MSCs act in tissue repair is mainly related to their paracrine effect. Indeed, MSCs provide microenvironment with a multitude of trophic signals including growth factors and cytokines. It is likely that in parallel to soluble factors, MSCs release microvesicles (EVs) that contribute to the reparative process by intercellular cross talk communication. Recent discoveries suggest that EVs have similar protective properties as their cellular counterparts to condition and reprogram the surrounding cells influencing a variety of endogenous responses in particular in injured tissues.

The aim of the study was to compare the immunomodulatory properties of human bone marrow mesenchymal stem cells (hBM-MSCs) and extracellular vesicles derived from these cells (EVs) transplanted in focal brain ischemic rats. Verification of therapeutic effects of MSCs or proposed EVs in experimental model of brain ischemia is necessary to begin clinical trials in patients.

Human bone marrow mesenchymal stem cells (hBM-MSCs) (Lonza) were used in our studies. The cells were labelled with two different dyes: lipophilic stain PKH26 and iron nanoparticles conjugated with rhodamine (Molday ION). Then EVs were isolated from the culture media by ultracentrifugation techniques. The size, morphology and biomarker expression of hBM-MSC-EVs were identified by NanoSight particle tracking analysis (NTA), high-resolution flow cytometric analysis (Apogee), transmission electron microscopy (TEM), superresolution structured illumination microscopy (SR-SIM) and MRI.

The *in vivo* studies were performed in adult male Wistar rats with focal brain injury of 1µl/50nmol ouabain injected into the right hemisphere. This cytotoxic brain injury model using ouabain (the inhibitor sodium-potassium pump) has been developed in our laboratory. Two days after ischemic insult 5×10^5 hBM-MSCs labeled with Molday ION or 1×10^9 hBM-MSC-EVs stained with PKH26 were transplanted into the right internal carotid artery of Wistar rats and the inflow of transplanted cells in the rat brain was monitored using MRI. At day 1, 3, 7 and 14 post-transplantation rats were decapitated and the brains, spleens and cervical lymph nodes were removed and the presence of the donor cells was confirmed by immunohistochemical studies. The cellular immune response in the brain was evaluated by immunohistochemical staining and the production of cytokines and chemokines was measured by Bio-Plex Pro™ Cytokine, Chemokine and Growth Factor Assay (BioRad).

Based on results from above studies:

- We optimized the method of isolation, staining and visualization of EVs with PKH26 or iron oxide nanoparticles (Molday) *in vitro* and *in vivo*
- Both dyes PKH26 and SPIO seem to be biocompatible with EVs and the labelling did not interfere with their capability to migrate *in vitro* and *in vivo*
- hBM-MSCs or EVs infused into the rat internal carotid artery migrated into the brain of graft recipients being visible in the right injured hemisphere using MRI or confocal microscope after immunohistochemical analysis up to 7 days after transplantation
- The decrease of activated microglia and the number of leukocytes evoked by ischemia in the brain tissue after hBM-MSCs or EVs transplantation was observed
- The infusion of hBM-MSCs or EVs led to the decrease of pro-inflammatory cytokines: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TGF- β 2 and chemokines: CXCL1, MIP-1 α , MIP-3 α , MCP-1 in comparison to untreated rats with focal brain injury

The results of our studies show that mesenchymal stem cells or extracellular vesicles released from them transplanted intra-arterially attenuate local immune response evoked by ischemic brain insult in rats. Moreover, it seems that MSC-derived EVs have function similar to their cellular counterparts and represent a promising opportunity to develop a novel cell-free therapy approaches.

The alternative therapeutic strategy with EVs allows avoiding the risk connected with using stem or genetically modified cells. It might develop innovative treatment methods and expand the scale of therapeutic application in CNS disorders. Moreover, replacement the necessity of cell transplantation by microvesicles isolated from them can simplify the application and reduce the risk of microembolism during systemic cell infusion.

Innowacyjność rozprawy doktorskiej

- Opracowanie metody izolacji zewnątrzkomórkowych pęcherzyków z ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego (EVs);
- Wieloaspektowe badania morfologii i funkcji EVs w warunkach *in vitro* i *in vivo* przy jednoczesnym zastosowaniu nowoczesnych metod, m.in. wysokorozdzielczej cytometrii przepływowej ApoGee A50-Micro, analizy immunoenzymatycznej Luminex, wizualizacji NanoSight, transmisyjnej mikroskopii elektronowej, super rozdzielczej mikroskopii SIM i mikroskopii konfokalnej oraz MRI;
- Porównanie wpływu znakowania EVs przy pomocy lipofilnego markera PKH26 i nanocząstek żelaza skoniugowanych z rodaminą B (Molday ION) na funkcje pęcherzyków i możliwość ich identyfikacji w badaniach *in vitro* i *in vivo*;
- Wykazanie obecności przeszczepionych dotętniczo EVs w prawej półkuli mózgu szczura z ogniskowym uszkodzeniem prążkowiec;
- Potwierdzenie immunomodulacyjnego działania EVs zarówno w przypadku odpowiedzi wrodzonej, jak i adaptacyjnej, obserwowanej u szczurów po uszkodzeniu mózgu, porównywalnego do efektu działania mezenchymalnych komórek macierzystych u biorców przeszczepów (*przedmiot zgłoszenia patentowego nr P. 425 406/2018*)

1. Przegląd piśmiennictwa

1.1. Niedokrwienie mózgu

Niedokrwienie mózgu jest jednym z ważniejszych problemów klinicznych chorób ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Występujący w następstwie niedokrwienia zespół objawów określany mianem udaru powoduje wysoki wskaźnik śmiertelności chorych, a trudności diagnostyczne i ograniczone możliwości terapii stwarzają istotne problemy społeczne. Udar mózgu stanowi trzecią, co do częstości występowania, przyczynę śmierci osób po 60. roku życia w krajach rozwiniętych i wiodącą przyczynę niepełnosprawności. Szacuje się, że każdego roku 15 milionów ludzi na świecie jest dotkniętych udarem mózgu, z czego 5 milionów osób umiera, a kolejne 5 milionów cierpi z powodu długotrwałej niepełnosprawności (Roy-O'Reilly i wsp., 2014). Ze statystyk światowych wynika, że udar mózgu częściej dotyka kobiety i stanowi drugą przyczynę śmierci osób płci żeńskiej po 60. roku życia oraz 60% wszystkich zgonów spowodowanych udarem (Samai i wsp., 2015). Wg dostępnych danych na leczenie ludzi po udarze przeznaczane jest od 3% do 7% wszystkich środków finansowych służby zdrowia w krajach rozwiniętych (Chamorro i wsp., 2016). W Polsce corocznie odnotowuje się ok. 60 tysięcy przypadków udaru, z czego połowa ludzi dotkniętych udarem umiera w ciągu pierwszego roku, a druga połowa pozostaje niepełnosprawna.

Udar niedokrwienny stanowi 87% wszystkich przypadków udaru mózgu. W wyniku zablokowania dopływu krwi do mózgu ograniczone jest dostarczenie tlenu i substancji odżywczych, które skutkuje poważnym uszkodzeniem tkanki nerwowej (Roy-O'Reilly i wsp., 2014). Głównymi czynnikami zwiększającymi częstość występowania udaru niedokrwiennego mózgu są: nadciśnienie, choroba wieńcowa, cukrzyca, palenie tytoniu, hipercholesterolemia, przemijający atak niedokrwienny, migotanie przedsionków (Schneider i wsp., 2004).

Podczas niedokrwienia mózgu obserwuje się uszkodzenie tkanki nerwowej w dwóch obszarach – w obszarze „ischemicznego rdzenia”, w którym przepływ krwi jest mniejszy niż 10mL/100g/min i gdzie dochodzi do gwałtownej śmierci większości komórek oraz w obszarze „ischemicznego półcienia”, w którym przepływ krwi wynosi 10–20mL/100g/min, gdzie nie stwierdza się śmierci neuronów, lecz widoczne są zmiany w strukturze tkanki. Deprywacja tlenu i glukozy w obszarze „ischemicznego rdzenia” prowadzi do obniżenia produkcji neuronalnego ATP, co powoduje spadek gradientu jonowego wzdłuż błony komórkowej i wzrost poziomu jonów Na^+ i Ca^{2+} w cytoplazmie. Uwolnienie i akumulacja glutaminianu oraz aktywacja receptorów NMDA i AMPA prowadzi do dalszego napływu jonów Ca^{2+} do komórek (Roy-O'Reilly i wsp., 2014). W wyniku tych procesów dochodzi do uszkodzenia błony cytoplazmatycznej komórek, zniszczenia struktur komórkowych, aktywacji procesów „zapalnych” oraz apoptozy i nekrozy komórek (Gervois i wsp., 2016). W obszarze półcienia, podwyższenie poziomu glutaminianu pochodzącego z obszaru „rdzenia ischemicznego” indukuje wzrost jonów Ca^{2+} i zwiększenie aktywności enzymów Ca^{2+} -zależnych, co stymuluje produkcję mediatorów apoptozy, takich jak tlenek azotu, wolne rodniki, czy kwas arachidonowy (Roy-O'Reilly i wsp., 2014). Procesy te mogą inicjować programowaną śmierć komórek lub nekrozę w zależności od wielkości uszkodzenia i stanu metabolicznego neuronów.

Obecnie w terapii chorych po udarze niedokrwiennym stosowane jest leczenie reperfuzyjne z udziałem leków trombolitycznych, takich jak podawany dożylnie tkankowy aktywator plazminogenu (tPA) lub mechaniczna trombektomia (MT). Niestety terapie te mają wiele ograniczeń, przede wszystkim krótki czas zastosowania, który wynosi do 4,5 godziny od wystąpienia udaru niedokrwiennego w przypadku tPA oraz do 6-8 godzin w przypadku MT. Ponadto tkankowy aktywator plazminogenu nie jest skuteczny w przypadku pacjentów, u których wystąpiła wysoka niedrożność tętnicy, gdy powstały zakrzep jest duży lub udar obejmuje rozległy obszar (Bhaskar

i wsp., 2018). Stosowana rehabilitacja chorych po udarze niedokrwiennym nie zawsze jest skuteczna i w wielu przypadkach nie przywraca utraconych funkcji. Stąd poszukiwanie nowych strategii terapeutycznych, mających na celu zarówno protekcję pozostałych w obszarze półcienia neuronów oraz zapobieganie dalszemu uszkodzeniu komórek podczas reperfuzji tkanki w fazie ostrej udaru, jak i odbudowę obumarłych komórek w dłuższym okresie po udarze (Gervois i wsp., 2016). Prowadzone aktualnie badania ukierunkowane są nie tylko na eliminację procesów patofizjologicznych zachodzących w komórkach nerwowych po udarze niedokrwiennym, ale również na modulację lokalnych procesów zapalnych towarzyszących ischemii.

1.2. Reakcje „zapalne” towarzyszące procesom ischemii mózgu

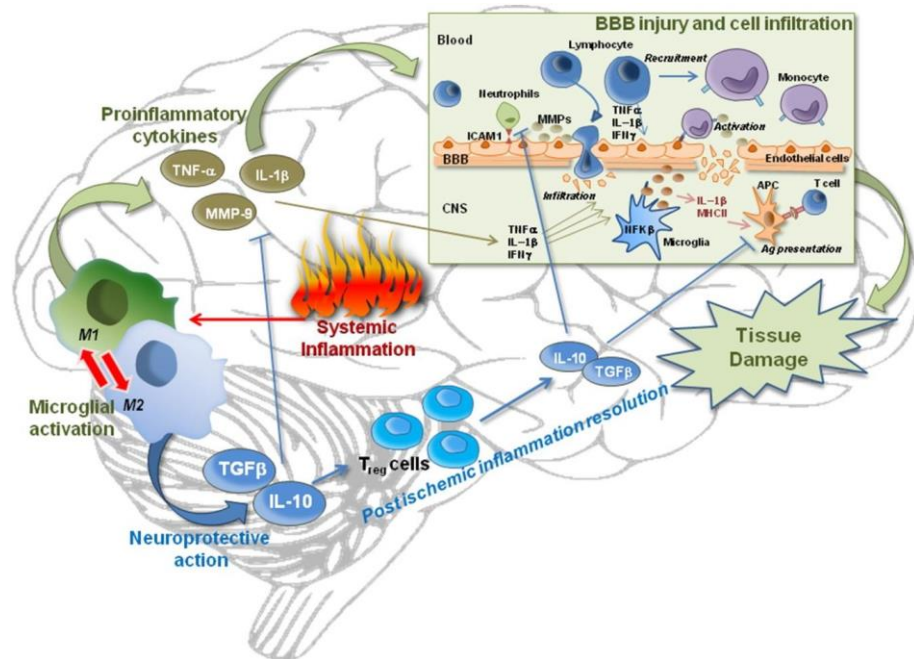
Udarowi towarzyszą zmiany typowe dla „zapalenia sterylnego” (*ang. sterile inflammation*), gdzie układ odpornościowy reaguje na zmiany w tkance spowodowane niedokrwieniem bez obecności czynnika zakaźnego.

1.2.1. Lokalne reakcje komórkowe towarzyszące ischemii mózgu

W krótkim czasie od wystąpienia udaru niedokrwiennego mózgu uszkodzone neurony i komórki glejowe produkują cząsteczki wzorców molekularnych związanych z uszkodzeniem (DAMPs) oraz cytokiny i reaktywne formy tlenu, które oddziałują na astrocyty powodując ich aktywację utrzymującą się do 28 dni od epizodu niedokrwienia. Aktywowane astrocyty są zdolne do szybkiej proliferacji, zmieniają swój kształt i funkcje (Ahmad i wsp., 2014). Po aktywacji wydzielają cytokiny prozapalne, chemokiny oraz metaloproteiny (Dong i wsp., 2001). Czynniki uwalniane z astrocytów, w tym interleukina 1 β (IL-1 β) i metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs), przyczyniają się do uszkodzenia bariery krew-mózg i wzmożonej infiltracji leukocytów z krwi do tkanki nerwowej. Napływ tych komórek przyczynia się do dalszej progresji uszkodzenia w fazie podostrej udaru, co ma miejsce w pierwszych godzinach lub dniach po niedokrwieniu. Astrocyty mogą pełnić także pozytywną rolę w odpowiedzi na ischemię. W wyniku polaryzacji zmieniają swój fenotyp i są zdolne do wychwytu zewnątrzkomórkowego glutaminanu, mogą także wydzielać czynniki neurotroficzne, działając protekcyjnie na uszkodzoną tkankę nerwową mózgu (Amantea i wsp., 2015).

Komórki mikrogleju, podobnie jak astrocyty, stanowią pierwszą linię wrodzonej odpowiedzi immunologicznej w OUN. Po upływie kilku minut od wystąpienia udaru mózgu dochodzi do aktywacji komórek mikrogleju, szczyt tej aktywacji widoczny jest zwykle po upływie 48-72 godzin, a zmiany w populacji komórek mikrogleju utrzymują się do kilku tygodni od momentu uszkodzenia tkanki (Denes i wsp., 2007). Aktywowane komórki mikrogleju zmieniają swój kształt na ameboidalny, nabywają zdolności do fagocytozy (Ahmad i wsp., 2014). Rezydujące w tkance nerwowej mózgu komórki mikrogleju mogą po aktywacji pełnić funkcje komórek prezentujących antygen (APC) limfocytom T lub dodatkowo zwiększać odpowiedź limfocytów T na antygeny głównego układu zgodności tkankowej (MHC) klasy II poprzez wzrost ekspresji dodatkowych molekuł m.in takich, jak: CD40, CD80 and CD86 (Yang i wsp., 2010a). Podobnie jak w przypadku astrocytów mikroglej może pełnić rolę zarówno komórek aktywujących jak i hamujących odpowiedź immunologiczną w tkance po niedokrwieniu mózgu. Komórki mikrogleju o fenotypie M1 wydzielają mediatory prozapalne, takie jak interleukina 1 (IL-1), czynnik martwicy nowotworu α (TNF- α) i metaloproteinazę macierzy zewnątrzkomórkowej 9 (MMP-9), które biorą udział w rozszczelnieniu bariery krew-mózg. Zmiana fenotypu komórek mikrogleju z M1 na M2 powoduje uwolnienie cytokin przeciwzapalnych, między innymi transformującego czynnika wzrostu β (TGF- β) oraz interleukiny 10 (IL-10), aktywujących

limfocyty regulatorowe ($CD4^+CD25^+$), które modulują reakcje immunologiczne, ograniczając niekorzystne działanie czynników zapalnych (Picascia i wsp., 2015).



Ryc. 1. Mechanizmy pierwotnej i wtórnej odpowiedzi immunologicznej aktywowane po udarze niedokrwiennym mózgu (Picascia i wsp., 2015).

Aktywacja astrocytów i komórek mikrogleju oraz uwalnianie przez nie czynniki powodują dalsze rozszczelnienie bariery krew-mózg i zwiększoną migrację leukocytów z krwi obwodowej (Whitney i wsp., 2009). W ciągu pierwszych 24 godzin od wystąpienia niedokrwienia mózgu obserwuje się zwiększony napływ monocytów do uszkodzonej tkanki. W populacji monocytów widoczne są komórki o fenotypie $CD14^+CD16^-$, które mają właściwości prozapalne oraz monocytów $CD14^+CD16^+$ o właściwościach przeciwzapalnych (Gliem i wsp., 2012). Zwiększoną liczbę monocytów obserwuje się do 7 dni po udarze, co ciekawe, udział monocytów prozapalnych maleje z upływem czasu, natomiast procent monocytów przeciwzapalnych zwiększa się. Towarzyszy temu spadek mediatorów zapalnych, takich jak $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ i chemokiny z grupy CC(β) ligand 2 (CCL2), a wzrost czynników przeciwzapalnych, w tym $TGF-\beta 1$ (Kim i wsp., 2014). Z upływem czasu w uszkodzonej tkance mózgu widoczna jest przewaga makrofagów typu M2, pochodzących, co ciekawe, z monocytów prozapalnych ($CD14^+CD16^+$) napływających z krwi we wczesnej fazie po udarze (Gliem i wsp., 2016). Zmiana odpowiedzi, w której zaangażowane są makrofagi typu M1 ($CD16^+$, $CD32^+$, $CD86^+$), na reakcję związaną z udziałem makrofagów M2 ($CD206^+$, Arginaza-1 $^+$) jest istotna z punktu widzenia procesów regeneracji w uszkodzonej tkance. Makrofagi typu M2, znane ze swoich właściwości immunoregulacyjnych w dotychczasowych badaniach *in vitro* (Mosser i Edwards, 2008), odgrywają istotną rolę w endogennych procesach naprawy i neuroprotekcji uszkodzonej w wyniku niedokrwienia mózgu tkanki nerwowej (Gliem i wsp., 2016).

Efektorami wrodzonej odpowiedzi immunologicznej w mózgu oprócz astrocytów, komórek mikrogleju i makrofagów są także neutrofile. Pojawiają się w uszkodzonej tkance mózgu tuż po udarze (Price i wsp., 2004). Gromadząc się w okolicy niedokrwienia uwalniają cytokiny pro-zapalne, wolne rodniki tlenowe i enzymy proteolityczne, powodując dodatkowe zniszczenie tkanki nerwowej szczególnie w strefie półcienia otaczającej rdzeń uszkodzenia (Wang i Qin, 2010; Amantea i wsp.,

2015). Liczba neutrofilii obecnych w mózgu po niedokrwieniu odpowiada bezpośrednio wielkości uszkodzenia ischemicznego (Ahmad i wsp., 2014). Zwiększony napływ neutrofilii z łożyska naczyniowego jest wynikiem produkcji przez nie MMP3 i MMP9 i rozszczelnieniem bariery krew mózg (Shichita i wsp., 2009). Z najnowszych badań Neumanna i wsp. wynika, że interakcja neutrofilii z komórkami mikrogleju powoduje zahamowanie efektu neuroprotekcynowego i zwiększenie obszaru lezji po udarze mózgu (Neumann i wsp., 2018). Fagocytoza neutrofilii przez komórki mikrogleju w tkance po udarze może mieć istotne znaczenie w ograniczaniu uszkodzenia wywołanego niedokrwieniem (Cuartero i wsp., 2013; Neumann i wsp., 2018).

Aktywowane po udarze mózgu komórki pierwotnej odpowiedzi immunologicznej indukują mechanizmy wtórnej (nabytej) reakcji immunologicznej. Kluczową rolę we wtórnych procesach odpornościowych odgrywają napływające z krwi obwodowej limfocyty. Pierwszego dnia po niedokrwieniu mózgu dochodzi do infiltracji zarówno limfocytów T, jak i B.

W uszkodzonej na skutek udaru tkance nerwowej obserwowane są zarówno limfocyty T $\alpha\beta$, jak i limfocyty T $\gamma\delta$ (Gelderblom i wsp., 2009). Wśród bezpośrednich mechanizmów uszkodzenia związanych z działaniem limfocytów T $\alpha\beta$ wydaje się cytotoksyczność perforyn uwalnianych przez komórki T CD8⁺ i efekt IL-21 produkowanej przez limfocyty T CD4⁺ (Liesz i wsp., 2011; Clarkson i wsp., 2014). Z kolei limfocyty T regulatorowe (T_{regs}), wykazują właściwości protekcyjne szczególnie w późniejszej fazie po udarze mózgu. Wydaje się, że pozytywny efekt związany jest z uwalnianiem IL-10 i TGF- β (Liesz i wsp., 2013) i hamującym działaniem limfocytów T_{regs} na produkcję MMP9 przez neutrofile (Li i wsp., 2013). Jakkolwiek z badań innych autorów wynika, że limfocyty T regulatorowe mogą mieć działanie niekorzystne, powodując upośledzenie mikrokrążenia w uszkodzonej po udarze tkance (Kleinschnitz i wsp., 2013).

Ostatnie doniesienia sugerują, że regulatorowe limfocyty B w większym stopniu niż regulatorowe limfocyty T hamują napływ komórek prozapalnych do miejsca uszkodzenia. Myszy $\mu\text{MT}^{-/-}$ z deficytami komórek B wykazywały większy obszar lezji po niedokrwieniu mózgu i znacznie dłuższy czas poprawy stanu neurologicznego niż myszy „dzikie” (Ren i wsp., 2011). Limfocyty B w ostrej fazie udaru działają protekcyjne na uszkodzoną tkankę nerwową poprzez produkcję interleukiny 10 (IL-10), hamują wytwarzanie cytokin prozapalnych przez limfocyty T. Jednak supresja odpowiedzi immunologicznej po udarze przez limfocyty B jest kwestionowana przez innych autorów. Wyniki badań Elvingtona i wsp. wskazują na patologiczną rolę immunoglobulin, gromadzących się w tkance nerwowej, w tym autoprzeciwciał przeciwko fosfolipidom, które indukują śmierć neuronów i zwiększają obszar uszkodzenia, co ma miejsce po upływie 4-7 tygodni od niedokrwienia (Elvington i wsp., 2012). Wykazano również, że akumulacja przeciwciał koreluje z upośledzeniem funkcji hipokampa, co skutkuje zaburzeniami pamięci krótkotrwałej w ciągu kilku tygodni od wystąpienia udaru niedokrwiennego (Selvaraj i wsp., 2016). Jednak w przypadku dożylnego podania immunoglobulin obserwuje się blokowanie aktywacji białek dopełniacza i wyraźny efekt neuroprotekcynowy w modelu ischemii mózgu (Arumugam i wsp., 2009).

Szereg prac podkreśla znaczący udział limfocytów T $\gamma\delta$ w odpowiedzi immunologicznej po udarze. Mechanizmy efektorowe limfocytów T $\gamma\delta$ związane są z produkcją interleukiny 17 (IL-17). Synergistyczna stymulacja astrocytów przez IL-17 i TNF- α , uwalniany po niedokrwieniu przez aktywowane komórki mikrogleju i makrofagi, powoduje infiltrację neutrofilii w odpowiedzi na zwiększoną ilość chemokin w uszkodzonej tkance, w tym chemokiny grupy CXC ligand 1 (CXCL-1). Blokowanie IL-17 za pomocą przeciwciał lub zahamowanie aktywacji CXCL-1/CXCR2 (receptora 2 chemokiny grupy CXC) obniża poziom reakcji zapalnej po udarze i zmniejsza obszar lezji (Gelderblom i wsp., 2012).

W wyniku udaru niedokrwiennego w mózgu pojawiają się komórki NK. Wydaje się, że komórki NK biorą udział we wczesnej fazie odpowiedzi immunologicznej na uszkodzenie tkanki.

Wykazano, że śmierć neuronów związana jest z działaniem interferonu γ (IFN γ) i perforyn, uwalnianych przez komórki NK w 3 godziny po reperfuzji (Iadecola i wsp., 2011; Gan i wsp., 2014).

W odpowiedź immunologiczną po niedokrwieniu mózgu zaangażowane są także komórki dendrytyczne (DCs). Wykazano, że oprócz swojej klasycznej roli w antygenozależnej odpowiedzi, DCs są zdolne modulować miejscowe reakcje w tkance, niezależnie od migracji do narządów limfatycznych czy prezentacji antygenów (Steinman i Idoyaga, 2010; Satpathy i wsp., 2013). W niedokrwieniu mózgu, znaczna liczba komórek CD11c pozytywnych pojawia się po 24 godzinach od uszkodzenia i jest najwyższa po 3 dniach. Komórki dendrytyczne obecne w uszkodzonej półkuli mózgu prezentują fenotyp CD172a⁺/IRF4⁺. Produkowana przez nie interleukina 23 (IL-23) indukuje uwolnienie IL-17 z limfocytów T $\gamma\delta$, a w konsekwencji infiltrację neutrofili do uszkodzonej tkanki (Gelderblom i wsp., 2018).

W reakcjach „zapalnych” po udarze niedokrwinnym biorą także udział mastocyty – komórki tuczne, które są obecne w oponach mózgowo-rdzeniowych, jak i naczyniach krwionośnych mózgu. Mastocyty wydzielają ziarnistości cytoplazmatyczne zawierające substancję naczynioaktywną - histaminę, antykoagulant – heparynę, TNF- α i proteazy, m.in. takie, jak tryptaza, chymaza i metaloproteinazy (MMP-2 i MMP-9), przyczyniając się do uszkodzenia bariery krew-mózg, obrzęku mózgu i infiltracji neutrofili do uszkodzonej tkanki nerwowej (Lindsberg i wsp., 2010; Strbian i wsp., 2006). Komórki tuczne mają zdolność do fagocytozy, mogą także pełnić rolę komórek prezentujących antygen i modulować mechanizmy wtórnej odpowiedzi immunologicznej (Rao i Brown, 2008).

1.2.2. Mediatorsy reakcji zapalnych

W wyniku udaru mózgu obserwuje się zmiany w poziomie cytokin i chemokin, będących mediatorami procesów „zapalnych”. Białka te są wydzielane przez aktywowane komórki obecne w mózgu, takie jak neurony i komórki glejowe oraz komórki napływające z krwi obwodowej po uszkodzeniu bariery krew-mózg, mogą mieć działanie pro- albo przeciwzapalne.

Interleukina 1 (IL-1) jest główną cytokiną prozapalną pojawiającą się już kilka godzin po ischemicznym uszkodzeniu mózgu. IL-1 α produkowana jest głównie przez komórki mikrogleju (Luheshi i wsp., 2011), jej źródłem mogą być także astrocyty, komórki śródbłonna i neurony (Amantea i wsp., 2010). IL-1 stymuluje astrocyty do wydzielania cytokin i chemokin oraz zwiększenia produkcji MMP-9, co powoduje rozszczelnienie bariery krew-mózg (Yang i wsp., 2007). Ponadto oddziałuje na komórki śródbłonna, zwiększając uwalnianie cząsteczek adhezyjnych, głównie cząsteczek adhezji międzykomórkowej 1 (ICAM-1) i cząsteczek adhezji komórkowej naczyń 1 (VCAM-1), inicjując wnikanie neutrofili do uszkodzonej tkanki (Sobowale i wsp., 2016).

W początkowej fazie po udarze, w uszkodzonej tkance mózgu pojawia się interleukina 6 (IL-6) (Smith i wsp., 2004), jej podwyższony poziom obserwuje się nawet do 12 miesięcy po niedokrwieniu (Nagayama i wsp., 1999). W tkance nerwowej IL-6 produkowana jest przez komórki mikrogleju, makrofagi pochodzące z monocytów krwi obwodowej, astrocyty i neurony (Suzuki i wsp., 1999). IL-6 początkowo była uważana za cytokinę o działaniu prozapalnym, w oparciu o najnowsze badania wiadomo, że IL-6 może pełnić dualistyczną rolę w odpowiedzi na niedokrwienie. Stymulując limfocyty T i B, aktywując białka ostrej fazy przyczynia się do powiększenia uszkodzenia mózgu (Smith i wsp., 2004). Inne badania eksperymentalne wykazały, że IL-6 może działać neuroprotekcynie (Loddick i wsp., 1998; Matsuda i wsp., 1996). Biologiczna aktywność IL-6 wzmacnia działanie IL-1, co ciekawe może także hamować jej efekt prozapalny poprzez syntezę antagonisty jej receptora (IL-1Ra) (Lambertsen i wsp., 2012).

Istotnymi cytokinami o działaniu prozapalnym, które pojawiają się w mózgu w wyniku niedokrwienia są interleukina 17A (IL-17A) i interleukina 23 (IL-23). IL-17A wydzielana przez

limfocyty T $\gamma\delta$ w wyniku ich aktywacji poprzez kaskadę cytokin, uwalnianych przez limfocyty T $\alpha\beta$ i komórki mikrogleju w następstwie uszkodzenia mózgu, inicjuje infiltrację neutrofilii. Dotychczasowe badania wykazały, że zablokowanie IL-17A za pomocą specyficznych przeciwciał działa neuroprotekcynie (Gelderblom i wsp., 2012; Gelderblom i wsp., 2014). IL-23 jest produkowana przez makrofagi M2 i komórki dendrytyczne. Jej podwyższy poziom w mózgu obserwuje się już 24 godziny po wystąpieniu niedokrwienia. Głównym działaniem IL-23 jest aktywacja limfocytów T $\gamma\delta$ (Shichita i wsp., 2009). Zahamowanie kaskady IL-23/IL-17 ogranicza wielkość lezji po udarze (Gelderblom i wsp., 2018).

Wraz ze wzrostem IL-1, IL-6, IL-17 i IL-23, obserwowanym kilka godzin po ischemii, pojawia się czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α). Wydaje się, że TNF- α odpowiedzialny jest za inicjowanie procesu zapalnego po uszkodzeniu mózgu. W początkowym okresie po udarze TNF- α produkowany jest przez neurony, w późniejszej fazie przez komórki mikrogleju, ale także astrocyty oraz limfocyty i makrofagi pochodzące z krwi obwodowej. Podwyższony poziom TNF- α w krwi i płynie mózgowo-rdzeniowym chorych stwierdza się po 24 godzinach od wystąpienia udaru niedokrwienego i utrzymuje się przez 1-2 tygodni (Zaremba i wsp., 2001). TNF- α powoduje apopotozę neuronów, powiększenie obszaru uszkodzenia i zwiększenie deficytów neurologicznych (Pettigrew i wsp., 2008). TNF- α indukuje migrację leukocytów z łożyska naczyniowego w okolice lezji (Iadecola i wsp., 2011). Badania eksperymentalne wykazały, że specyficzne przeciwciała anty-TNF- α podane zwierzętom do układu komorowego przed wywołaniem epizodu niedokrwienia miały działanie neuroprotekcyjne ograniczając obszar uszkodzenia (Nawashiro i wsp., 1997).

Inną cytokiną prozapalną biorącą udział w reakcjach po ischemii mózgu jest interferon gamma (INF- γ) produkowany przez leukocyty, w tym głównie przez limfocyty T $\alpha\beta$ oraz komórki NK (Schoenborn i wsp., 2007). Badania eksperymentalne wykazały podwyższony poziom INF- γ 24-72 godzin od wystąpienia udaru niedokrwienego. Głównym działaniem INF- γ jest aktywacja wydzielania chemokiny grupy CXC ligand 10 (IP-10/CXCL10) (Zhang i wsp., 2014). Systemowe podanie przeciwciał neutralizujących działanie INF- γ zwierzętom po udarze zmniejsza naciek limfocytów T w uszkodzonej tkance i ogranicza wielkość uszkodzenia (Seifert i wsp., 2014).

Pojawiająca się w wyniku ischemii mózgu interleukina 4 (IL-4) pełni funkcje regulatorowe. Produkowana jest głównie przez limfocyty T $\alpha\beta$, ale także komórki NK, mastocyty (Paul, 2015) i uszkodzone neurony (Zhao i wsp., 2015). Główną rolą IL-4 jest kontrola różnicowania limfocytów Th2 i limfocytów B. Badania OUN dowiodły, że IL-4 stymuluje konwersję komórek mikrogleju/makrofagów z fenotypu prozapalnego M1 w komórki przeciwwapalne o fenotypie M2, działając w ten sposób protekcynie na uszkodzoną tkankę nerwową (Zhao i wsp., 2015).

Wśród cytokin działających przeciwwapalnie, podczas niedokrwienia mózgu obserwuje się wzrost poziomu interleukiny 10 (IL-10). Co ciekawe, towarzyszy temu obniżenie IL-10 w krwi obwodowej pacjentów w fazie ostrej udaru, w ciągu pierwszych 12-24 godzin od jego wystąpienia (Basic Kes i wsp., 2008; Vila i wsp., 2003). IL-10 uwalniana przez komórki mikrogleju o fenotypie M2, aktywowane astrocyty i napływające limfocyty T regulatorowe, hamuje syntezę cytokin prozapalnych, promuje przeżycie neuronów i komórek glejowych, działając protekcynie i regenerująco na uszkodzoną tkankę nerwową (Picascia i wsp., 2015). Badania eksperymentalne wykazały, że podanie IL-10 szczurom z ogniskowym niedotlenieniem mózgu powoduje ograniczenie uszkodzenia tkanki (Grilli i wsp., 2000). Dane o neuroprotekcynym działaniu IL-10 znalazły również potwierdzenie w badaniach klinicznych (Garcia i wsp., 2017).

Inną cytokiną odgrywającą korzystną rolę w odpowiedzi immunologicznej po udarze jest transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β). Podwyższony poziom TGF- β jest obserwowany w krwi pacjentów w pierwszym dniu po udarze niedokrwienym (Yan i wsp., 2012). W eksperymentalnych modelach ischemii mózgu wzrost TGF- β widoczny był w ciągu pierwszych godzin od wystąpienia

epizodu niedokrwienia. W uszkodzonej tkance nerwowej TGF- β produkowany jest przez komórki mikrogleju o fenotypie M2 oraz limfocyty T regulatorowe (Lehrmann i wsp., 1998). Neuroprotektoryjne działanie TGF- β jest wynikiem aktywacji wielu mechanizmów zabezpieczających neurony przed śmiercią, w tym ograniczenie uszkodzenia związanego z ekscytotoksycznym działaniem glutaminianu, zmniejszenie wydzielania chemokin, między innymi białka chemotaktycznego monocytów (MCP-1) i białka zapalnego makrofagów 1 α (MIP-1 α), oraz hamowaniem apoptozy komórek w uszkodzonej tkance nerwowej (Amantea i wsp., 2015).

Wzrostowi aktywności cytokin w tkance nerwowej po ischemii mózgu towarzyszy wzrost poziomu chemokin - białek wiążących heparynę, o masie 8-14 kDa, działających poprzez receptory powierzchniowe należące do nadrodziny receptorów sprzężonych z białkami G (GPCRs). Ze względu na budowę wyróżnia się cztery grupy chemokin: CXC(α), CC(β), CX3C(δ) i C(γ). W odpowiedzi immunologicznej po udarze chemokiny wykazują działanie zarówno pro- jak i przeciwzapalne, a ich rolą jest rekrutacja leukocytów do miejsca uszkodzenia oraz pobudzenie komórek immunologicznie czynnych (Le Thuc i wsp., 2015).

Jedną z chemokin pojawiających się po niedokrwieniu mózgu jest chemokina grupy CXC ligand 12 (CXCL12), nazywana również zrębowym czynnikiem wzrostu (SDF-1), produkowana głównie przez uszkodzone neurony. Badania wykazały, że CXCL12 łącząc się z receptorem CXCR4 działa prozapalnie w ostrej fazie udaru niedokrwienego. Zablockowanie CXCL12 lub jej receptora skutkuje zmniejszeniem infiltracji leukocytów w miejscu uszkodzenia, obniżeniem produkcji cytokin prozapalnych oraz ograniczeniem uszkodzenia bariery krew-mózg (Huang i wsp., 2013; Ruscher i wsp., 2013). W późniejszych fazach udaru CXCL12 odgrywa korzystną rolę poprzez aktywację procesów neurogenezy i angiogenezy (Li i wsp., 2014), ma również działanie protekcyjne na nowopowstałe neurony (Shin i wsp., 2014).

Chemokiną uwalnianą podczas ostrej fazy udaru niedokrwienego jest chemokina grupy CXC ligand 1 (CXCL1) znana także pod nazwą GRO lub KC. CXCL1 wydzielana jest głównie przez makrofagi i komórki śródbłonna, znaczny wzrost jej poziomu stwierdzono w płynie mózgoworodzeniowym po 24 godzinach od ischemii (Losy i wsp., 2005) i w surowicy krwi pacjentów (Ormstad i wsp., 2011). Główną funkcją CXCL1 jest pobudzanie infiltracji neutrofilów, jak również innych komórek immunologicznie czynnych do miejsca uszkodzenia, co skutkuje wzmocnieniem reakcji zapalnych i obumieraniem komórek nerwowych w obszarze niedokrwienia mózgu (Silva i wsp., 2015).

Mediatorem „reakcji zapalnych” po udarze jest chemokina z grupy CC(β) ligand 2 (CCL2), zwana także białkiem chemotaktycznym monocytów (MCP-1), produkowana przez komórki mikrogleju, astrocyty, neurony oraz napływające leukocyty. Do znacznego podwyższenia MCP-1 dochodzi już w kilka godzin po niedokrwieniu mózgu, poziom ten utrzymuje się przez kilka dni po ischemii (Che i wsp., 2001). W ostrej fazie udaru niedokrwienego MCP-1 ma działanie prozapalne. Badania wykazały, że zablockowanie chemokiny lub jej receptora CCR2 powodowało ograniczenie infiltracji monocytów z krwi do uszkodzonej tkanki, obniżenie produkcji cytokin prozapalnych, zmniejszenie przepuszczalności bariery krew-mózg oraz zmniejszenie obszaru lezji (Dimitrijevic i wsp., 2007; Strecker i wsp., 2013). W dłuższym czasie od wystąpienia ischemii wykazano pozytywne działanie MCP-1 w procesach regeneracji zniszczonej tkanki. Badania Liu i wsp. udowodniły, że MCP-1 bierze udział w procesach neurogenezy poprzez rekrutację neuroblastów ze strefy podkomorowej do miejsca uszkodzenia (Liu i wsp., 2007) i utrzymywanie integralności jednostki neurowaskularnej (Gliem i wsp., 2012).

W odpowiedzi na udar niedokrwienny mózgu zaangażowane są białka zapalne makrofagów (MIP): MIP-1 α (CCL3) i MIP-3 α (CCL20). Z dotychczasowych badań wynika, że MIP-1 α wydzielane jest głównie przez komórki mikrogleju i monocyty, a jego najwyższy poziom obserwuje się w czasie

od 8 do 72 godzin po ischemii. Do najważniejszych działań MIP-1 α należy rekrutacja monocytów do uszkodzonej tkanki nerwowej oraz aktywacja astrocytów i komórek mikrogleju (Cowell i wsp., 2002). Białko MIP-3 α jest uwalniane głównie przez astrocyty w obecności IL-1 β i TNF α . Istotą działania MIP-3 α jest stymulacja produkcji IL-1 β i syntazy tlenu azotu. Doświadczenia Terao i wsp. wykazały, że zablokowanie wydzielania MIP-3 α skutkuje zmniejszeniem obszaru uszkodzenia w modelu ischemii mózgu u szczura (Terao i wsp., 2009).

Inną chemokina produkowaną w dużej ilości przez neurony, astrocyty, komórki mikrogleju oraz napływające makrofagi, limfocyty T i komórki NK jest chemokina grupy CX3C ligand 1 (CX3CL1) nazywana fraktalkiną lub neurotaktyną. Badania eksperymentalne prowadzone na modelu ischemii mózgu u myszy wykazały, że zablokowanie CX3CL1 lub jej receptora CX3CR1 skutkuje ograniczeniem negatywnych skutków niedokrwienia tkanki, w tym reakcji ekscytotoksyczności, produkcji reaktywnych form tlenu (ROS), wydzielania cytokin prozapalnych, uszkodzenia bariery krew-mózg, infiltracji leukocytów i apoptozy komórek w uszkodzonym obszarze (Soriano i wsp., 2002; Dénes i wsp., 2008). Rosito i wsp., zauważyli, że fraktalkina pobudza wydzielanie chemokiny grupy CXC ligand 16 (CXCL16) przez komórki glejowe działając protekcyjnie na uszkodzoną tkankę nerwową i ograniczając ekscytotoksyczność wywołaną obecnością glutaminianu (Rosito i wsp., 2014).

W odpowiedzi immunologicznej po udarze niedokwiennym bierze udział wiele enzymów. Do najważniejszych należą metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej, w tym MMP-2 i MMP-9, których poziom i aktywność wzrasta w krótkim czasie po ischemii. MMPs uczestniczą w procesie rozszczelniania bariery krew-mózg, są także odpowiedzialne za niszczenie osłonek mielinowych aksonów (Cunningham i wsp., 2005). Wydaje się, że w dłuższym czasie od wystąpienia niedokrwienia metaloproteinazy odgrywają korzystną rolę poprzez aktywację produkcji czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), istotnego w procesie tworzenia nowych naczyń oraz poprzez kondycjonowanie środowiska (Zhao i wsp., 2006).

Udar niedokrwienno powoduje zwiększenie wytwarzania cyklooksygenazy (COX-2) indukowanej przez neurony, neutrofile i komórki śródbłonna. COX-2 powoduje nasilenie reakcji zapalnych poprzez udział w tworzeniu toksycznych prostanoidów i nadtlenców, jego zablokowanie skutkuje zmniejszeniem uszkodzenia bariery krew-mózg i ograniczeniem napływu leukocytów z krwi do mózgu (Candelario-Jalil i wsp., 2007). Podczas ischemii dochodzi także do indukcji syntazy tlenu azotu (NOS), która powoduje uwalnianie dużych ilości tlenu azotu (NO) przez neurofile, komórki mikrogleju, makrofagi i komórki śródbłonna. W początkowym etapie po udarze NO pełni korzystną rolę poprzez indukowanie rozszerzania naczyń krwionośnych, natomiast w późniejszych fazach nasila uszkodzenie tkanki nerwowej (Murphy i wsp., 2007). Ostatnie badania wskazują, że syntaza tlenu azotu poprzez kondycjonowanie środowiska może działać neuroprotekcyjnie na obszar niedokrwienia (Peng i wsp., 2012).

Terapie eksperymentalne mające na celu ograniczenie reakcji immunologicznych, powstałych po udarze niedokwiennym, z zastosowaniem inhibitorów komórek immunologicznie czynnych czy mediatorów zapalenia nie przyniosły jak dotąd oczekiwanych rezultatów. W tej sytuacji poszukiwane są nowe strategie terapeutyczne, wykorzystujące mechanizmy immunomodulacji, wśród których wielkie nadzieje budzą przeszczepy mezenchymalnych komórek macierzystych.

1.3. Mezenchymalne komórki macierzyste

1.3.1. Odkrycie i źródła mezenchymalnych komórek macierzystych

Mezenchymalne komórki macierzyste (*mesenchymal stem cells* - MSCs) są niehematopoetycznymi, multipotencjalnymi komórkami macierzystymi, zgodnie ze swoją nazwą

wywodzącymi się ze środkowego listka zarodkowego – mezodermy. Po raz pierwszy zostały znalezione w szpiku kostnym przez Friedensteina na przełomie lat sześćdziesiątych i siedemdziesiątych XX wieku i opisane jako komórki przypominające fibroblasty, adherentne do plastiku, tworzące klony, ze zdolnościami do samoodnowy *in vitro* i różnicowania się w osteoblasty, chondrocyty i adipocyty (Friedenstein i wsp., 1970). Przez wiele lat MSCs były nazywane komórkami macierzystymi zrębu szpiku kostnego (Friedenstein i wsp., 1987; Friedenstein i wsp., 1974). Nazwa „mezenchymalne komórki macierzyste” (*ang. mesenchymal stem cells*) została po raz pierwszy wprowadzona przez Caplana w 1991 roku (Caplan, 1991). Wielu badaczy określa MSCs mianem „mezenchymalnych komórek zrębu” (*ang. mesenchymal stromal cells*) ze względu na ich pochodzenie. W 2017 roku Caplan zasugerował, że należy zmienić nazwę MSCs na „lecnicze komórki sygnalizacyjne” (*ang. medicinal signaling cells*) dla podkreślenia faktu, iż MSCs migrują do miejsca uszkodzenia lub zmienionego na skutek choroby i wydzielają biologicznie aktywne czynniki o działaniu regeneracyjnym i immunomodulacyjnym (Caplan, 2017).

Szpick kostny jest jednym z najczęściej i najszerzej wykorzystywanych źródeł MSCs, w którym mezenchymalne komórki macierzyste stanowią 0.001-0.01% komórek jednojądrzastych (Pittenger i wsp., 1999; Penforinis i wsp., 2011; Gardner i wsp., 2015). Mezenchymalne komórki macierzyste mogą być także izolowane z innych źródeł. Procedura izolacji MSCs z różnych tkanek od dorosłych dawców jest mało inwazyjna i nie wzbudza sprzeciwów natury etyczno-prawnej. Wielu badaczy pozyskuje mezenchymalne komórki macierzyste z tkanek płodu, takich jak krew pępowinowa (Lee i wsp., 2004b; Vasaghi i wsp., 2013), galareta Whartona sznura pępowinowego (Wang i wsp., 2004; Qiao i wsp., 2008), łożysko (Semenov i wsp., 2010; Pelekanos i wsp., 2016) czy płyn owodniowy (Murphy i wsp., 2013). W ostatnich latach coraz więcej badań przeprowadza się wykorzystując mezenchymalne komórki macierzyste izolowane z tkanki tłuszczowej (Bunnell i wsp., 2008; Mahmoudifar i wsp., 2015). Ponadto możliwe jest pozyskiwanie MSCs z innych źródeł, takich jak skóra (Li i wsp., 2015), płuca (Bernal i wsp., 2012), wątroba (Wang i wsp., 2016) miazga zębów (Huang i wsp., 2009), endometrium (Gargett i wsp., 2009), jajowód (Jazedje i wsp., 2009), przednie lub tylne wiązadła krzyżowe kolana (Cheng i wsp., 2009).

1.3.2. Charakterystyka mezenchymalnych komórek macierzystych

Zgodnie z zalecaniami Komitetu d/s Mezenchymalnych Komórek Macierzystych i Komórek Macierzystych Tkanek Międzynarodowego Towarzystwa Terapii Komórkowych, oprócz charakterystycznych dla wszystkich komórek macierzystych zdolności do proliferacji i samoodnowy, ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste muszą spełniać następujące kryteria:

- zdolność do przyklejania się do plastiku i wzrostu na jego powierzchni w standardowych warunkach laboratoryjnych;
- obecność markerów typowych dla MSCs: CD105, CD73, CD90, w co najmniej 95% komórek oraz brak markerów komórek hematopoetycznych: CD45, CD34, CD14 lub CD11b, CD79 α , CD19, ludzkich antygenów leukocytarnych (HLA klasy II), mierzonych za pomocą cytometrii przepływowej;
- zdolność do różnicowania w trzy rodzaje komórek: osteoblasty, adipocyty i chondroblasty w standardowych warunkach *in vitro*.

Kryteria te są typowe dla ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych. MSCs izolowane z innych gatunków zwierząt muszą być zdolne do adhezji do powierzchni plastiku i różnicowania się w trzy typy komórek, ale mogą różnić się ekspresją antygenów powierzchniowych. (Dominici i wsp., 2006).

Mezenchymalne komórki macierzyste rosnące w hodowli *in vitro* na powierzchni plastiku mają kształt podłużny, wrzecionowaty, swoją morfologią przypominają fibroblasty. Początkowo uważano, że populacja MSCs jest homogenna w ponad 98% i składa się z jednakowych, symetrycznych, wrzecionowatych komórek (Pittenger i wsp., 1999). Jednak późniejsze badania wykazały, że kolonie MSCs są heterogenne i składają się z mniejszych wrzecionowatych komórek zdolnych do szybszej samoodnowy i większych komórek o kształcie sześciennym lub rozplaszczonych, wolniej proliferujących. Grupa Coltera przedstawiła trzeci typ komórek, opisywanych jako bardzo małe komórki zdolne do gwałtownej samoodnowy (RS), wykazujące największy potencjał do różnicowania, uważane za wczesne progenitory komórkowe (Colter i wsp., 2001).

W hodowli *in vitro* mezenchymalne komórki macierzyste wysiane na powierzchnię plastiku osiągają stan konfluencji po upływie 5-7 dni. Po zajęciu całego obszaru naczynia zaczynają rosnąć w kilku warstwach, zmieniają swój kształt, rozplaszczając się, widoczne są ich liczne rozgałęzienia (Bobis i wsp., 2006). MSCs zdolne są do 25-40 podwojeń populacji, co stanowi 8-15 pasaży, z zachowaniem zdolności do różnicowania (Wagner i wsp., 2007). W warunkach laboratoryjnych wzrost MSCs przebiega w trzech fazach, są to: faza początkowa (lag phase) trwająca 3-4 dni, faza gwałtownego wzrostu (log phase) i faza stacjonarna (Colter i wsp., 2001). Badania wykazały, że zmiana faz związana jest z różną ekspresją genów, w tym genów Dickkopf, których najwyższy poziom odnotowuje się w fazie gwałtownego wzrostu i genów Wnt5a, które ekspresjonowane są na najwyższym poziomie w fazie stacjonarnej (Gregory i wsp., 2003). Ponadto analiza cyklu komórkowego MSCs dowiodła, że większość, bo aż 89% komórek, znajduje w fazie G0/G1, 6% w fazie G(2)/M a 5% w fazie S cyklu komórkowego. Komórki te zachowują normalny kariotyp (Qiao i wsp., 2008).

W warunkach *in vivo* MSCs zasiedlają specjalne miejsca w różnych tkankach organizmu zwane niszami komórek macierzystych. Określone mikrośrodowisko panujące w niszach i oddziaływanie z innymi komórkami sprawiają, że komórki mezenchymalne pozostają w nich w stanie uśpienia i aktywują się dopiero pod wpływem czynnika uszkodzającego, chorobotwórczego czy procesu starzenia. Hipoteza o istnieniu niszy komórek macierzystych w szpiku kostnym została stworzona przez Schofielda w latach siedemdziesiątych XX wieku (Schofield i wsp., 1978). W mechanizm pozwalający komórkom na pozostanie w stadium uśpienia lub rozpoczęcie procesu różnicowania zaangażowany jest prawdopodobnie szlak sygnałowy Wnt (Van Camp i wsp., 2014).

Oprócz markerów stosowanych w klasyfikacji MSCs, takich jak CD105(SH2), CD73(SH3 i SH4) i CD90 (Thy-1), mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego wykazują obecność innych antygenów, m.in. takich, jak: CD10, CD13, CD146, CD271, CD44, Stro-1, SSEA-4 (specyficzny dla stadium antygen embrionalny 4), GD2 (neuralny gangliozyd), 3G5, SSEA-3 (specyficzny dla stadium antygen embrionalny 3), Sca-1 (antygen komórek macierzystych 1), Stro-4, MSCA-1 (antigen mezenchymalnych komórek macierzystych), PODXL, Sox1, TM4SF1 (Lv i wsp., 2014). MSCs nie mają białek typowych dla komórek hematopoetycznych i endotelialnych: CD11b, CD14, CD31, CD33, CD34, CD133 i CD45 (Pittenger i wsp., 1999). Ponadto komórki mezenchymalne posiadają mRNA dla cząsteczek adhezji komórkowej, takich jak CD106 (VCAM-1), CD166 (ALCAM- cząsteczka aktywująca adhezję komórkową leukocytów), CD29 (integryny beta 1), CD49a, b, c, e i f (integryny alfa 1, 2, 3, 4 i 6), integryny alfa 11, CD51 (integryny alfa V), CD54 (ICAM-1), E-kadheryny, CD56 (NCAM – cząsteczki adhezji neuronów) (Brooke i wsp., 2008). Badania wykazały, że na powierzchni MSCs pochodzących ze szpiku kostnego obecne są receptory dla chemokin z grupy CC, w tym CCR1, CCR3, CCR7, CCR9, CCR10 oraz z grupy CXC, m.in. takich, jak CXCR3, CXCR4, CXCR5 i CXCR6 (Honczarenko i wsp., 2006; Brooke i wsp., 2008).

Ważną cechą mezenchymalnych komórek macierzystych jest ich niska immunogenność. MSCs wykazują niewielką ekspresję białek MHC klasy I, nie wykazują ekspresji cząsteczek kostymulujących. Wiele badań *in vitro* dowiodło, że mezenchymalne komórki macierzyste nie indukują odpowiedzi immunologicznej ze strony limfocytów allogenicznych (Nauta i Fibbe, 2007). Doświadczenia *in vivo* potwierdziły, że MSCs nie wywołują typowej odpowiedzi immunologicznej po przeszczepie allogenicznym, co stwarza możliwość wykorzystania MSCs pochodzących od innych dawców w terapiach klinicznych (Koç i wsp., 2002). Jednak inni badacze wskazują, że MSCs w specyficznych warunkach środowiska mogą indukować reakcje odpornościowe. Chan i współpracownicy wykazali, że MSCs wykazują funkcje komórek prezentujących antygeny i pod wpływem interferonu- γ aktywują limfocyty T (Chan i wsp., 2006). Eliopoulos i wsp. zaobserwowali, że podane podskórnym drogą allogeniczne MSCs były odrzucane u nieimmunizowanych myszy, czemu towarzyszył wzrost INF- γ (Eliopoulos i wsp., 2005). Jednak pomimo negatywnych wyników niektórych grup eksperymentatorów, większość przeprowadzonych badań potwierdziła niską immunogenność MSCs i ich przeżycie w organizmie biorcy po transplantacjach allogenicznych i ksenogenicznych.

1.3.3. Właściwości i mechanizm działania MSCs

Czynniki wzrostu, chemokiny i cytokiny wydzielane przez uszkodzone komórki mają zdolność do stymulacji i mobilizacji mezenchymalnych komórek macierzystych. Pod wpływem mediatorów, takich jak czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), czynnik pochodzenia stromalnego 1 (SDF-1), czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (G-CSF), czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF), erytropoetyna (EPO), angiopoetyna 2, łożyskowy czynnik wzrostu (PIGF), płytkopochodny czynnik wzrostu (PDGF), czynnik wzrostu komórek macierzystych (SCF), insulinopodobny czynnik wzrostu (IGF-1), epidermalny czynnik wzrostu (EGF), czynnik wzrostu hepatocytów (HGF) oraz cytokin, m.in. takich, jak: IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-8 i TNF- α oraz chemokin, w tym CCL5 i CCL22, dochodzi do aktywacji MSCs, ich migracji i osiedlenia się w odpowiedniej tkance (Ding i wsp., 2011; English i wsp., 2013). W przemieszczaniu i kolonizacji MSCs biorą udział białka obecne na powierzchni mezenchymalnych komórek macierzystych, takie jak receptory dla chemokin z grupy CC i CXC, integryny beta1 i alfa4 oraz ligandy integryn VCAM i ICAM (Sohni i Verfaillie, 2013).

Po zasiedleniu docelowego miejsca w tkance MSCs proliferują i różnicują się w różne typy komórek. Procesy te są regulowane przez oddziaływanie szlaków sygnałowych białek Wnt, Notch i Hedgehog (Van Camp i wsp., 2014). Mezenchymalne komórki macierzyste mogą namnażać się, a następnie przekształcać się w wyspecjalizowane komórki tworzące daną tkankę, zastępując w ten sposób komórki obumierające. Wykazano, że MSCs posiadają zdolność do różnicowania się nie tylko w komórki linii mezodermalnej: osteoblasty, chondrocyty, adipocyty (Pittenger i wsp., 1999) i miocyty (Alimperti i wsp., 2014; Xu i wsp., 2004), ale w komórki linii endodermalnej: hepatocyty (Lee i wsp., 2004a; Stock i wsp., 2014), komórki wysp trzustkowych (Bai i wsp., 2015) czy linii ektodermalnej: neurony (Guan i wsp., 2014). Ponadto MSCs mogą łączyć się z innymi typami komórek poprzez fuzję komórkową, w konsekwencji „ratując” uszkodzone lub obumierające komórki (Spees i wsp., 2016).

Działanie mezenchymalnych komórek macierzystych może być związane nie tylko z mechanizmem bezpośrednim, poprzez ich różnicowanie się i zastępowanie uszkodzonych komórek, ale przede wszystkim z ich właściwościami parakrynnymi. MSCs produkują liczne substancje, takie jak cytokiny, chemokiny i czynniki wzrostu, które mogą działać protekcyjnie i regenerująco na inne komórki, a także stymulować ich proliferację i różnicowanie. Do najważniejszych wydzielanych

czynników wzrostu należą: TGF β , VEGF, IGF-1, SDF, GM-CSF, G-CSF, HGF, EGF, czynnik wzrostu fibroblastów (FGF), czynnik wzrostu nerwów beta (NGF β), czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów (M-CSF) i czynnik hamujący białaczkę (LIF). Ponadto mezenchymalne komórki macierzyste produkują szereg cytokin, w tym IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, TNF α i chemokiny: CXCL12 (SDF-1), CCL2, CCL5, które odpowiadają za wiele funkcji MSCs, przede wszystkim za ich działanie immunomodulacyjne (Dabrowska i wsp., 2018; Kim i wsp., 2005a; Liu i wsp., 2013; Zimmerlin i wsp., 2013). Wytwarzają białka macierzy zewnątrzkomórkowej, takie jak fibronektyna, laminina, kolagen i proteoglikany (Bobis i wsp., 2006).

MSCs mogą przekazywać liczne molekuly takie jak białka i kwasy nukleinowe, ale przede wszystkim całe organella, w tym głównie mitochondria, za pomocą nanorurek tunelujących (TNTs). Grupa Prockopa jako pierwsza wskazała, że ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste współhodowane z komórkami nabłonkowymi płuc ustalonej linii, pozbawionymi mitochondriów działają protekcyjnie na uszkodzone komórki poprzez transfer mitochondriów i mitochondrialnego DNA (Spees i wsp., 2006). Transfer mitochondriów przez MSCs za pośrednictwem TNTs do innych typów komórek, takich jak komórki śródbłonna czy kardiomiocyty, został także opisany przez innych autorów (Spees i wsp., 2016).

1.3.4. Funkcje biologiczne MSCs

Jedną z najwcześniej poznanych funkcji mezenchymalnych komórek macierzystych jest zapewnienie odpowiedniego mikrośrodowiska hematopoetycznym komórkom macierzystym (HSCs) w szpiku kostnym. MSCs stanowią mechaniczną podporę dla komórek hematopoetycznych, dzięki produkcji licznych białek macierzy zewnątrzkomórkowej, takich jak fibronektyna, laminina, kolagen, czy proteoglikany (Charbord i wsp., 2010). Ponadto dzięki wydzielanym cytokinom, chemokinom i czynnikom wzrostu mezenchymalne komórki macierzyste regulują proces hematopoezy. Badania *in vitro* z wykorzystaniem współhodowli komórek wykazały, że MSCs produkują czynniki wzrostu, m.i. takie, jak SCF i GM-CSF oraz interleukiny, w tym IL-6, IL-7 i IL-11 aktywując komórki hematopoetyczne do proliferacji i różnicowania w kierunku limfocytów, monocytów, bazofili, eozynofili, erytrocytów, a także megakariocytów (Diaz-Solano i wsp., 2012). Udowodniono, że chemokina CXCL12 produkowana przez komórki mezenchymalne pełni kluczową rolę we wroście i utrzymaniu HSCs w niszach komórek macierzystych szpiku kostnego (Anthony i Link, 2014). Badania Muguruma i wsp. wykazały, że MSCs przeszczepione u myszy mogą różnicować się w perycyty, miofibroblasty, komórki zrębu, osteocyty i komórki endotelialne oraz promują zwiększenie liczby funkcjonalnie i fenotypowo niedojrzałych komórek hematopoetycznych (Muguruma i wsp., 2006).

Kolejnym ważnym zadaniem mezenchymalnych komórek macierzystych jest udział w procesie angiogenezy. MSCs produkują liczne czynniki wzrostu, cytokiny i chemokiny, które indukują proliferację, migrację i przetrwanie komórek śródbłonna, aktywują tworzenie i dojrzewanie naczyń krwionośnych (Bronckaers i wsp., 2014). Badania grup Kinnaird i Hung'a. udowodniły, że mezenchymalne komórki macierzyste aktywują proliferację i migrację komórek endotelialnych poprzez wydzielanie czynników proangiogennych: VEGF i FGF indukując proces angiogenezy (Kinnaird i wsp., 2004; Hung i wsp., 2007). Wyniki eksperymentów Wu i wsp. wykazały, że przeszczepione mezenchymalne komórki szpiku kostnego biorą udział w procesie gojenia się ran poprzez wydzielanie VEGF i angiopoetyny 1 (Wu i wsp., 2007).

Inną funkcją mezenchymalnych komórek macierzystych jest działanie neuroprotekcyjnie na uszkodzone lub obumierające komórki nerwowe, poprzez produkcję różnych czynników wzrostu i cytokin. Badania wielu autorów udowodniły, że mediatory wydzielane przez MSCs, takie jak

neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (BDNF), glijopochodny czynnik neurotroficzny (GDNF), neurotrofina-3 (NT-3), NGF i VEGF, działają neuroprotekcynie na komórki nerwowe, powodując ich przetrwanie i aktywując wzrost (Mead i wsp., 2014). Johnson i wsp. wykazali, że protekcyjne działanie mezenchymalnych komórek macierzystych na komórki nerwowe związane jest produkcją 11 czynników: BDNF, interferonu- γ , IL-6, IL-11, LIF, NGF, PDGF-AA, PDGFAB/BB, SCF, melatony i trombospondyny 1 (Johnson i wsp., 2014). Ponadto MSCs poprzez uwalnianie czynników, m.in. takich, jak TGF- β , VEGF czy IL-6 działają neuroprotekcynie na skrawki tkanki nerwowej uszkodzonej w wyniku deprywacji tlenu i glukozy (Dabrowska S i wsp., 2018).

Komórki mezenchymalne wykazują właściwości protekcyjne nie tylko w stosunku do komórek neuralnych, ale też innych typów komórek. Badania Preda i wsp. udowodniły, że przeszczepione MSCs pełnią funkcje kardioprotekcyjne, chroniąc komórki mięśnia sercowego przed uszkodzeniem niedokrwienno-reperfuzyjnym (Preda i wsp., 2014). Inne eksperymenty pokazują, że mezenchymalne komórki macierzyste dzięki aktywności parakrynej wykazują ochronne działanie na komórki w modelu ostrego uszkodzenia nerek wywołanego ischemią (Zhao i wsp., 2014). Doświadczenia z wykorzystaniem współhodowli wysp trzustkowych z komórkami mezenchymalnymi pochodzącymi ze szpiku kostnego szczura dowiodły, że właściwości cytoprotekcyjne i antyapoptotyczne MSCs są związane z wydzielaniem IL-6 i TGF- β i ekspresją genów antyapoptotycznych, m.i. takich, jak Mapkapk2, Tnip1 i Bcl3 (Karaoz i wsp., 2010).

Dzięki zdolności do samodnowy i różnicowania w różne linie komórkowe, mezenchymalne komórki macierzyste pełnią funkcje regeneracyjne poprzez zastępowanie obumierających komórek w różnych tkankach. Zgodnie ze standardowymi protokołami, MSCs w warunkach *in vitro* pod wpływem deksametazonu, glicerofosforanu i kwasu askorbinowego różnicują się w osteoblasty wykazujące obecność agregatów mineralnych i podwyższoną aktywność alkalicznej fosfatazy (Pittenger i wsp., 1999). Badania Pittinger'a i innych autorów dowiodły, że w proces osteogenezy zaangażowane są czynniki, takie jak białka morfogenetyczne kości (BMPs) oraz czynniki wzrostu: TGF, IGF, BDNF czy FGF-2 (Bobis i wsp., 2006). Z kolei pod wpływem pożywki stosowanej do hodowli wzbogaconej o insulinę-transferynę-selen (ITS), kwas linolowy, kwas selenawy, progronian, 2-fosforan askorbinianu, deksametazon i TGF- β mezenchymalne komórki macierzyste różnicują się w chondrocyty zawierające kolagen (Pittenger i wsp., 1999; Ullah i wsp., 2015). MSCs hodowane w pożywce, z dodatkiem deksametazonu, indometacyny, izobutyłu, metyloskaniny i insuliny mogą różnicować się w adipocyty, wykazujące po upływie trzech tygodni obecność kropli tłuszczowych oraz ekspresję genów specyficznych dla tych komórek, między innymi receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów γ (PPAR γ), białek adipocytów 2 (aP2) i lipazy lipoproteinowej (Pittenger i wsp., 1999; Rosen i wsp., 2006).

Badania Xu i wsp. wykazały, że mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego szczura mogą różnicować się pod wpływem 5-azacytydyny w kardiomiocyty, wykazując ekspresję genów specyficznych dla komórek mięśnia sercowego, w tym łańcuch ciężki miozyny β , aktynę sercową α i desminę (Xu i wsp., 2004). Doświadczenia Alimperti i wsp. pokazały natomiast, że MSCs poddane działaniu kadheryny-11 i TGF- β 1 przekształcają się w funkcjonalnie aktywne komórki mięśni gładkich (Alimperti i wsp., 2014). W specyficznych warunkach hodowli *in vitro* z ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego (hBM-MSCs) mogą powstać dojrzałe hepatocyty. W pierwszym etapie komórki różnicują się pod wpływem pożywki wzbogaconej w EGF, zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) i nikotynamid, a następnie dojrzewają przy udziale onkostatyny M, deksametazonu i ITS (Lee i wsp., 2004a; Stock i wsp., 2014). Badania Bai i wsp. udowodniły możliwość różnicowania się mezenchymalnych komórek macierzystych w komórki wysp trzustkowych, wykazujące ekspresję Pdx1, insuliny, and C-peptydu (Bai i wsp., 2015). Nieliczne doniesienia literaturowe wskazują, że komórki mezenchymalne mają

zdolność różnicowania się w komórki neuralne. Eksperymenty potwierdziły możliwość przekształcania się MSCs *in vitro* w dojrzałe neurony pod wpływem czynników wzrostu, takich jak bFGF, EGF, HGF, NT3, GDNF, czy BDNF (Guan i wsp., 2014; Ullah i wsp., 2015). Natomiast pod wpływem β -merkaptopetanolu (BME), kwasu retinowego (RA), bFGF, PDGF, forskoliny (FSK) i hereguliny (HRG) mezenchymalne komórki macierzyste różnicowały się w komórki Schwanna (Zhu i wsp., 2014).

1.3.5. Funkcje immunomodulacyjne MSCs

Jedną z najważniejszych funkcji mezenchymalnych komórek macierzystych jest ich działanie immunomodulacyjne. MSCs posiadają zdolność regulacji mechanizmów zarówno pierwotnej, jak i wtórnej odpowiedzi immunologicznej poprzez modulację reakcji komórkowych oraz wydzielanie mediatorów zapalnych. Proces immunomodulacji przebiega wieloetapowo i obejmuje: (1) rozpoznanie reakcji zapalnej i migrację MSCs do miejsca uszkodzenia, (2) „licencjonowanie” lub aktywację MSCs, (3) jeśli to konieczne indukowanie usuwania patogenów, (4) modulację stanu zapalnego (English i wsp., 2013).

Liczne badania udowodniły, że mezenchymalne komórki macierzyste mogą regulować aktywność makrofagów oraz komórek mikrogleju. MSCs oddziałując na makrofagi promują ich polaryzację z prozapalnego fenotypu M1 do komórek o fenotypie przeciwzapalnym M2, zmniejszają produkcję cytokin prozapalnych, takich jak TNF- α , IL-1, IL-6, IL12p70, IFN- γ oraz zwiększają wydzielanie cytokin przeciwzapalnych, w tym IL-10, IL-12p40 (François i wsp., 2012; Maggini i wsp., 2010). Doświadczenia Giunti i wsp. wykazały, że MSCs aktywują komórki mikrogleju do produkcji czynników związanych z działaniem neuroprotekcijnym: CX3CR1, jądrowego receptora typu 4, receptora CD200 i IGF-1 (Giunti i wsp., 2012). Działanie mezenchymalnych komórek macierzystych na makrofagi i komórki mikrogleju wiąże się z produkcją przez MSCs 2,3-dioksygenazy indoloaminy (IDO) i prostaglandyny E-2 (PGE-2) (François i wsp., 2012; Maggini i wsp., 2010).

Mezenchymalne komórki macierzyste mogą modulować działanie neutrofilów. Doświadczenia wykazały, że interleukina-6 produkowana przez MSCs aktywuje czynniki transkrypcyjne STAT3, co skutkuje zwiększeniem przeżywalności granulocytów obojętnochłonnych (van den Akker i wsp., 2013). Z drugiej strony IL-6 wpływa na zmniejszenie wytwarzania reaktywnych form tlenu przez neutrofile, co osłabia niekorzystne działanie tych komórek (Raffaghello i wsp., 2008). Ponadto komórki mezenchymalne wydzielają IDO, który hamuje produkcję α -denfensyny magazynowanej w ziarnistościach wydzielniczych neutrofilów o właściwościach prozapalnych (Quinn i wsp., 2008). Z kolei prostaglandyna-2 uwalniania przez MSCs stymuluje makrofagi i komórki mikrogleju do produkcji IL-10, co ogranicza napływ neutrofilów do uszkodzonej tkanki. Wydzielana IL-10 działa również na komórki śródbłonna powodując zmniejszenie ekspresji E-selektyny i hamując przechodzenie neutrofilów do miejsca uszkodzenia (van den Akker i wsp., 2013).

Komórki mezenchymalne oddziałują z komórkami dendrytycznymi (DCs), ograniczając ich funkcje, w tym zdolność migracji, dojrzewanie, czy prezentację antygenów. Liczne doświadczenia potwierdziły, że MSCs obniżają ekspresję markerów dojrzałych DCs w tym MHC klasy II, cząsteczek, takich jak CD40, CD80 i CD86 oraz modulują ekspresję markerów „osadzania się” DCs w węzłach chłonnych, w tym chemokiny CCR7 (Djouad i wsp., 2007). Badania Li i wsp. wykazały, że regulacja dojrzewania komórek dendrytycznych może odbywać się za pośrednictwem cytokin produkowanych przez MSCs, takich jak IL-6 lub za pomocą kontaktu bezpośredniego z wykorzystaniem szlaku sygnałowego Notch (Li i wsp., 2008). Mezenchymalne komórki macierzyste mają zdolność zmiany fenotypu komórek dendrytycznych na przeciwzapalny. DCs pod wpływem MSCs zwiększają

wydzielanie cytokin przeciwzapalnych, w tym IL-10, obniżają produkcję cytokin prozapalnych, takich jak IL-12 i TNF- α oraz podwyższają swoją aktywność fagocytarną. Ponadto eksperymenty Zhang i wsp. dowiodły, że komórki dendrytyczne zmienione fenotypowo hamują reakcje nadwrażliwości *in vivo* (Zhang i wsp., 2009; Liu i wsp., 2012), nie są zdolne do aktywacji limfocytów T pomocniczych (Chiesa i wsp., 2011), natomiast indukują tworzenie antygenowo specyficznych limfocytów T regulatorowych (Li i wsp., 2008).

Mezenchymalne komórki macierzyste mogą modulować działanie komórek wtórnej odpowiedzi immunologicznej. Jednym z zadań MSCs jest utrzymanie odpowiedniej równowagi pomiędzy limfocytami T CD4 o fenotypie Th1 i Th2. Liczne badania *in vitro* i *in vivo* dowiodły, że MSCs aktywują zmianę limfocytów T CD4 o fenotypie prozapalnym Th1, wydzielających IL-1 α , IL-1 β , IFN- γ i TNF- α w komórki o fenotypie przeciwzapalnym Th2, produkujące IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 i IL-13 (Bai i wsp., 2009; Batten i wsp., 2006). Z drugiej strony, w chorobach alergicznych MSCs powodują zmniejszenie wytwarzania cytokin Th2 zależnych i zwiększenie sekrecji cytokin Th1 zależnych, co zapewnia odpowiednią równowagę i działa protekcyjnie w chorobach alergicznych dróg oddechowych (Goodwin i wsp., 2011). Ponadto komórki mezenchymalne poprzez wydzielanie 2,3-dioksygenazy indoloaminy i prostaglandyny E-2 hamują różnicowanie limfocytów Th17 produkujących IL-17, na rzecz tworzenia limfocytów Th2 i limfocytów regulatorowych Treg (Bai i wsp., 2009; Ghannam i wsp., 2010). Ważną rolę w utrzymaniu odpowiedniej równowagi pomiędzy limfocytami pomocniczymi Th1, Th2 i Th17 oraz limfocytami regulatorowymi odgrywa produkowany przez MSCs TGF- β (Kong i wsp., 2009).

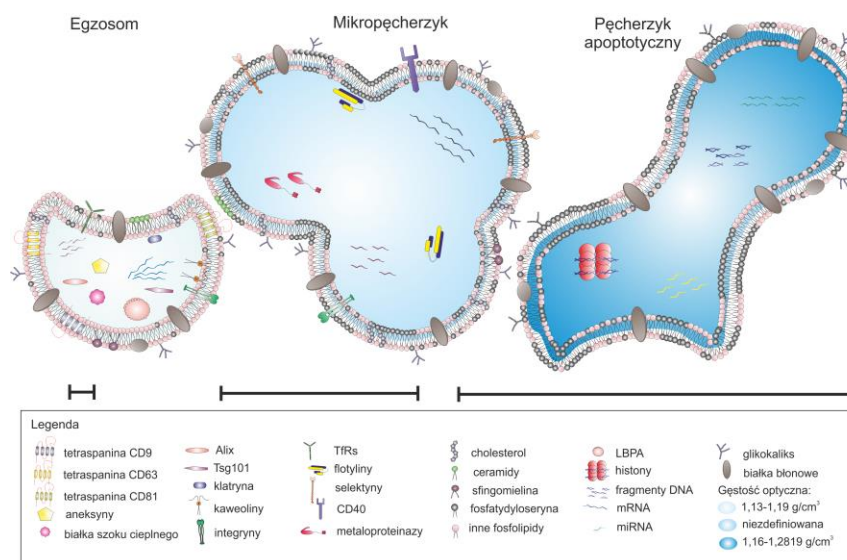
Kolejnym typem komórek, na które oddziałują mezenchymalne komórki macierzyste są limfocyty T CD8. MSCs poprzez hamowanie limfocytów Th1 i Th17 niezbędnych do aktywacji limfocytów T CD8 przyczyniają się do supresji działania tych komórek (van den Akker i wsp., 2013). Doświadczenia wykazały, że MSCs mogą także bezpośrednio zapobiegać działaniu cytotoksycznemu limfocytów CD8, głównie poprzez blokowanie ich proliferacji, a nie poprzez hamowanie efektu cytotoksycznego (Rasmusson i wsp., 2003).

Na skutek bezpośredniego kontaktu z mezenchymalnymi komórkami macierzystymi lub poprzez produkowane przez nie czynniki, m.i. takie, jak IDO, PGE-2 i TGF- β dochodzi do aktywacji powstawania antygenowo-specyficznych limfocytów T regulatorowych. Badania *in vitro* wykazały, że Treg oddziałują na limfocyty Th o fenotypie prozapalnym powodując zahamowanie ich proliferacji (English i wsp., 2009). Natomiast IL-4 i IL-13 produkowane przed limfocyty Th2 stymulują MSCs do produkcji TGF- β , który jest ważnym czynnikiem pobudzającym limfocyty T regulatorowe (Kong i wsp., 2009). Oprócz wspomnianych wcześniej czynników, tlenek azotu, galektyna-1 i semaforyna-3A produkowane przez MSCs stymulują różnicowanie limfocytów w kierunku Treg (Spees i wsp., 2016). Aktywacja Treg jest również głównym mechanizmem indukowanym przez MSCs umożliwiającym przyjęcie i przeżycie przeszczepów allogenicznych (Wang i wsp., 2009), a także ochronę przed niektórymi reakcjami autoimmunologicznymi i alergicznymi (English i wsp., 2013).

Komórki mezenchymalne oddziałują także na limfocyty B, zatrzymując je w fazie G0/G1, ograniczają ich aktywność chemotaktyczną (Corcione i wsp., 2006). Badania dowiodły, że MSCs mają zdolność do zmniejszenia aktywności, różnicowania i proliferacji limfocytów B za pośrednictwem ścieżki sygnałowej PD-1 (Augello i wsp., 2005). Ponadto mezenchymalne komórki macierzyste działają superesorowo na limfocyty T CD4, co skutkuje ograniczeniem wytwarzania cząsteczki kostymulującej CD40L i brakiem możliwości aktywacji limfocytów B (van den Akker i wsp., 2013). Doświadczenia Corcione i wsp. wykazały, iż MSCs mają zdolność hamowania wytwarzania przeciwciał (Corcione i wsp., 2006). Inni badacze opisali możliwość stymulacji proliferacji i różnicowania limfocytów B przez MSCs (Traggiai i wsp., 2008).

1.4.1. Rodzaje zewnątrzkomórkowych pęcherzyków

Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki (*extracellular vesicles* - EVs) są błonowymi strukturami wydzielanymi przez komórki, w tym także przez mezenchymalne komórki macierzyste. Stanowią one heterogenną populację złożoną z kilku rodzajów EVs różniących się pochodzeniem, wielkością, kształtem i zawartością. Zgodnie z klasyczną nomenklaturą, wśród zewnątrzkomórkowych pęcherzyków możemy wyróżnić trzy główne typy: egzosomy, mikropęcherzyki i ciała apoptotyczne (Koniusz S i wsp., 2016).



Ryc. 3. Rodzaje zewnątrzkomórkowych pęcherzyków wydzielanych przez komórki

Egzosomy są obecnie najlepiej opisanym typem zewnątrzkomórkowych pęcherzyków o wielkości od 30 nm do 120 nm, kulistym kształcie i dwuwarstwowej błonie lipidowej. Stanowią homogenną populację EVs, a ich gęstość optyczna wynosi od 1.13 do 1.19 g/cm³. Egzosomy powstają na drodze endocytozy, wydzielane są poprzez proces egzocytozy zgodnie z mechanizmem zależnym od aktywacji cytoszkieletu regulowanym przez białko p53, niezależnym od napływu jonów wapnia (Biancone i wsp., 2012; Tetta i wsp., 2011). W wyniku wpuklenia błon endosomalnych w późnych endosomach dochodzi do powstania ciał wielopęcherzykowych (MVBs), które łącząc się z błoną cytoplazmatyczną komórki uwalniają swoją zawartość na zewnątrz w postaci egzosomów (Lai i Breakefield, 2012a). Ten typ zewnątrzkomórkowych pęcherzyków charakteryzuje się obecnością wielu białek, w tym aneksyn, tetraspanin (CD63, CD81, CD9), białek szoku cieplnego (Hsp60, Hsp70 i Hsp90), klatryn, kaweolin, białek specyficznych dla egzosomów, takich jak: Alix i Tsg101 oraz białek typowych dla komórek, z których pochodzą (Biancone i wsp., 2012; Koniusz i wsp., 2016). Ponadto, egzosomy zawierają charakterystyczne dla nich lipidy, między innymi: fragmenty raft lipidowych - GM1 gangliozyd, cholesterol, ceramidy, sfingomielinę i fosfatydyloserynę (Subra i wsp., 2007). W egzosomach stwierdza się również obecność kwasów nukleinowych: mRNA i miRNA (Mathivanan i wsp., 2010).

Drugim typem zewnątrzkomórkowych pęcherzyków są mikropęcherzyki (MVs) nazywane ektosomami lub pączkującymi pęcherzykami. Mają one wielkość od 100 nm do 1 µm, są heterogenną populacją o nieregularnym kształcie, ich gęstość optyczna nie jest dobrze zdefiniowana. MVs powstają bezpośrednio z błony cytoplazmatycznej komórki, poprzez odpączkowanie od powierzchni

blony, a następnie oddzielenie powstałych struktur podobne do odłączania występującego podczas cytokinezy (Turturici i wsp., 2014). Badania wykazały, że napływ jonów wapnia odpowiada za zmiany w rozmieszczeniu fosfolipidów w błonie cytoplazmatycznej i prowadzi do formowania się mikropęcherzyków (Biancone i wsp., 2012). Z kolei proces odłączania pęcherzyków od błony komórkowej zależy oprócz obecności jonów wapnia od kalpajny, skramblazy, flopazy i przegrupowania cytoszkieletu (Cocucci i wsp., 2009). MVs wydzielane są przez komórki w stanie spoczynku oraz po aktywacji, wynikającej ze stresu oksydacyjnego, hypoksji czy uszkodzenia. Mikropęcherzyki nie zawierają białek zaangażowanych w proces endocytozy, ale wykazują obecność integryn, flotylin, selektyn, metaloproteinaz, białka CD40, niektóre z nich posiadają białka typowe dla egzosomów tzw. tetraspanin. Ponadto są bogate w lipidy, mają duże ilości fosfatydyloseryny i cholesterolu, a także sfingomielinę i ceramidy. Podobnie jak w egzosomach, w mikropęcherzykach gromadzone są kwasy nukleinowe: mRNA i miRNA (Mathivanan i wsp., 2010; Koniusz i wsp., 2016).

Trzecim typem zewnątrzkomórkowych pęcherzyków są ciała apoptotyczne nazywane pęcherzykami apoptotycznymi. Mają one wielkość od 50 nm do 4 μ m, większość z nich wykazuje rozmiary ponad 1 μ m, charakteryzują się nieregularnym kształtem (György i wsp., 2011). Ich gęstość optyczna waha się w granicach: 1.16-1.28 g/cm³. W przeciwieństwie do egzosomów i mikropęcherzyków, powstających fizjologicznie z żywych komórek, ciała apoptotyczne tworzą się z obumierających komórek będących w późnym stadium procesu apoptozy. W swoim wnętrzu zawierają histony, fragmenty organelli i błon komórkowych, kwasy nukleinowe: mRNA, miRNA oraz DNA, wykazują wysoką koncentrację fosfatydyloseryny, a ich błony są przepuszczalne (Turturici i wsp., 2014; Koniusz i wsp., 2016).

1.4.2. Skład EVs

Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki zawierają w swoim wnętrzu liczne związki, w tym: białka, lipidy i kwasy nukleinowe. Obecnie istnieją dwie publiczne bazy danych: EVpedia i ExoCarta, w których zebrane są informacje z wielu badań dotyczące zawartości EVs pochodzących z różnych typów komórek (Mathivanan i wsp., 2012; Choi i wsp., 2013). Sekretom zewnątrzkomórkowych pęcherzyków uwalnianych przez mezenchymalne komórki macierzyste nie jest stały ze względu na heterogenność populacji komórek, metody izolacji, różne pasażę komórek, czy źródła, z których są izolowane (Lavoie i wsp., 2013). Analiza proteomiczna EVs wyizolowanych z MSCs z różnych źródeł pozwoliła na zidentyfikowanie białek charakterystycznych dla nich (Skalnikova i wsp., 2011). Białka transportowane za pomocą EVs uczestniczą w przekazywaniu sygnałów pomiędzy komórkami, adhezji komórek, angiogenezie, apoptozie i reakcjach immunologicznych.

Do tej pory analiza składu białkowego zewnątrzkomórkowych pęcherzyków, wydzielanych przez MSCs, została przeprowadzona przez dwie grupy badaczy: Kim'a i wsp. oraz Lai i wsp. Pierwsza grupa badaczy zidentyfikowała za pomocą spektrometrii mas 730 białek obecnych w EVs, o wielkości od 50 nm do 200 nm, wyizolowanych z ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego metodą ultrawirowania (Kim i wsp., 2012). Natomiast Lai i wsp. używając tej samej techniki wykazali obecność 857 białek w egzosomach pozyskiwanych z ludzkich mezenchymalnych macierzystych, pochodzących z embrionalnych komórek macierzystych (Lai i wsp., 2012). Obie analizy potwierdzają występowanie 315 wspólnych białek znajdujących się w EVs wyizolowanych z MSCs.

Dotychczasowe badania z udziałem EVs wykazały, że w zewnątrzkomórkowych pęcherzykach zlokalizowane są tetraspaniny i białka typowe dla MSCs, w tym CD63, CD81, CD9, CD109, CD151, CD248 i CD276, receptory powierzchniowe, takie jak PDGF-RB (receptor dla płytkopochodnego czynnika wzrostu typu beta), EGF-R (receptor dla epidermalnego czynnika wzrostu)

i PLAUR (aktywator plazminogenu, receptor urokinazy) oraz cząsteczki sygnałowe: RRAS/NRAS, Wnt5B, MAPK1 (kinaza 1 aktywowana mitogenem), GNA13/GNG12, RHO, CDC42 i VAV2, biorące udział w procesach samoodnowy i różnicowania komórek (Kim i wsp., 2012). Ponadto w EVs zgromadzone są białka z grupy RAB, takie jak RAB1A, RAB2A, RAB5A/B/C, RAB7A i RAB8A regulujące transport i przyłączanie zewnątrzkomórkowych pęcherzyków do komórek (Kowal i wsp., 2014). Kim i wsp. wykazali również obecność białek związanych z adhezją komórek, między innymi: FN1, E2R, IQGAP1, CD47, LGALS1/LGALS3 i integryn, a także białek związanych z procesami migracji i morfogenezy (Kim i wsp., 2012). Lai i wsp. zidentyfikowali również inne białka obecne w EV, takie jak ACTA, Alix, ANX (aneksyny), HSP, TUB i TWHA (Lai i wsp., 2012b).

Ponadto analiza zewnątrzkomórkowych pęcherzyków pochodzących z komórek immunologicznie czynnych wykazała, że co najmniej 50% spośród badanych egzosomów posiada tetraspaniny, klatryny, aneksyny, GAPDH (dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerynowego), PK, EEF1A1 (czynnik elongacyjny 1 alfa 1), MFGES, MHC klasy I, kofilinę-1, ezrynę, radyksynę, moezynę, aktynę i tubulinę (Théry i wsp., 2009). Co ciekawe, niektóre dane literaturowe donoszą o obecności w EVs białek, których nie stwierdza się w komórkach, z których pochodzą; przykładem tego są tkankowe inhibitory metaloproteinaz TIMP-1 i TIMP-2 zidentyfikowane tylko w EVs, ale nie występujące w hBM-MSCs (Vallabhaneni i wsp., 2015).

W zewnątrzkomórkowych pęcherzykach zlokalizowane są różne rodzaje biologicznie aktywnych lipidów. Błony EVs pochodzących z różnych źródeł bogate są w cząsteczki kwasu lizobifosfatydowego regulujące proces odpączkowania mikropęcherzyków, a także w lipidy raft lipidowych, m.i. takie, jak cholesterol, ceramidy, sfingolipidy i glicofosfolipidy (Urbanelli i wsp., 2015). Sfingomielina i cholesterol umożliwiają ciasne upakowanie lipidów w błonę dwuwarstwową, zapewniają trwałość i stabilność EVs, chronią przed ich wychwytem przez komórki układu krwionośnego oraz ułatwiają łączenie zewnątrzkomórkowych pęcherzyków z innymi komórkami (Yoon i wsp., 2014). Ponadto badania Subry i wsp. wykazały, iż EVs zawierają mediatory lipidów, takie jak prostaglandyny, enzymy odpowiedzialne za tworzenie EVs, m.i. fosfolipazy A2, C i D oraz wolne kwasy tłuszczowe np. kwas arachidonowy (Subra i wsp., 2010).

Innymi ważnym składnikiem zewnątrzkomórkowych pęcherzyków, pochodzących z różnych typów komórek, są cząsteczki kwasu rybonukleinowego (RNA). Do najczęściej występujących rodzajów RNA obecnych we wszystkich typach EVs należą mRNA oraz miRNA (Rani i wsp., 2011). Dokładna analiza wykazała jednak, że w egzosomach wyizolowanych z mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z zarodkowych komórek macierzystych (ESC-MSCs) najczęściej występującym rodzajem miRNA jest nie dojrzałe miRNA, ale prekursorowe miRNA (pre-miRNA) (Chen i Lim, 2013). Co ciekawe, istnieją różnice pomiędzy miRNA, identyfikowanym w egzosomach i obecnym w komórkach, co wskazuje na aktywny proces sortowania i pakowania miRNA do zewnątrzkomórkowych pęcherzyków (Zhang i wsp., 2015a). W EVs pochodzących z MSCs zaobserwowano duże ilości transportującego RNA (tRNA), różniące się w zależności od tego, czy MSCs były izolowane z tkanki tłuszczowej, czy ze szpiku kostnego. Nie stwierdzono natomiast różnic w zawartości miRNA w zewnątrzkomórkowych pęcherzykach wywodzących się z różnych źródeł (Baglio i wsp., 2015). Ponadto w EVs obecne jest rybosomalne RNA (rRNA), występujące w zmiennej ilości zależnie od rodzaju komórek. W literaturze są doniesienia, że rRNA jest najczęściej występującym rodzajem RNA w EVs pochodzących z komórek raka piersi (Jenjaroenpun i wsp., 2013). Najnowsze badania wskazują również na zawartość w zewnątrzkomórkowych pęcherzykach małych, niekodujących cząsteczek RNA – piwi-interacting RNA (piRNA) (Ogawa i wsp., 2013).

1.4.3. Mechanizmy wychwytu EVs przez komórki

Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki uwolnione z komórek mogą rozpadać się i wydzielać swoją zawartość do przestrzeni międzykomórkowej lub wchodzić w bezpośrednie interakcje z innymi komórkami. Wyróżniamy trzy główne mechanizmy oddziaływań EVs z komórkami: fuzję, wychwyt endocytarny i związanie z receptorami powierzchniowymi. Mechanizmy te poprzedza przyłączenie ligandu do receptora komórkowego, w proces ten zaangażowane są liczne białka obecne na powierzchni EVs, w tym integryny, tetraspaniny, galektyny i inne białka adhezyjne (Rana i wsp., 2011; Raposo i Stoorvogel, 2013). Dotychczasowe badania dowiodły, że integryny $\beta 1$ i $\beta 2$ obecne na egzosomach pochodzących z limfocytów B mogą oddziaływać z macierzą zewnątrzkomórkową (ECM) i wiązać się z białkami ECM, takimi jak: kolagen czy fibronektyna (Clayton i wsp., 2004). EVs pochodzące z płytek krwi zawierają receptory dla cytokin, receptory komórek śródbłonna i inne ligandy umożliwiające adhezję płytek krwi (Baj-Krzyworzeka i wsp., 2002). W badaniach *in vitro* EVs pochodzące z płytek krwi oddziaływały na monocyty i komórki endotelialne, nie wykazywały reakcji z neutrofilami. Z kolei EVs wyizolowane z neutrofilów były zdolne do łączenia się z komórkami śródbłonna, monocytami i komórkami dendrytycznymi (Koniusz i wsp., 2016).

Po przyłączeniu się zewnątrzkomórkowych pęcherzyków do komórek, EVs mogą pozostać trwale związane z receptorami powierzchniowymi lub oddzielić się i połączyć bezpośrednio z błoną komórkową albo zostać wychwycone przez komórki na drodze endocytozy (Raposo i Stoorvogel, 2013). Internalizacja zewnątrzkomórkowych pęcherzyków do wnętrza komórek jest poprzedzona zmianą tempa poruszania się EVs po powierzchni błony komórkowej z powolnego dryfowania na szybkie przemieszczanie się (Tian i wsp., 2013). Po wychwyceniu przez komórki, EVs są segregowane w endosomach, następnie łączą się z lizosomami w celu degradacji lub z błonami endosomalnymi w celu uwolnienia swojej zawartości do cytoplazmy (Turturici i wsp., 2014). Inne badania wykazały, że EVs są gromadzone w przedziałach fagocytarnych i endocytarnych, a ich wychwyt jest zależny od aktywności aktyny, dynaminy-2 i 3-kinazy fosfatydyloinozytolu (Raposo i Stoorvogel, 2013).

1.4.4. Biologiczne funkcje EVs

Liczne badania wykazały, że zewnątrzkomórkowe pęcherzyki regulują szereg ważnych funkcji biologicznych, oddziałując na komórki docelowe poprzez różne mechanizmy. Istotną rolą EVs jest przekazywanie sygnałów pomiędzy komórkami. ICAM-1 obecny na powierzchni zewnątrzkomórkowych pęcherzyków oddziałuje z receptorami antygenów związanych z funkcją leukocytów (LFA-1) występującymi na limfocytach T, zaś δ -podobny ligand 4 z receptorami Notch na komórkach śródbłonna i komórkach neuralnych, powodując ich aktywację (Biancone i wsp., 2012; Nolte-t Hoen i wsp., 2009). EVs mają zdolność modulowania procesu morfogenezy. Dotychczasowe doświadczenia dowiodły, że morfogeny, takie jak Sonic hedgehog i kwas retinowy związane z błoną komórek nabłonkowych są przekazywane za pośrednictwem zewnątrzkomórkowych pęcherzyków w odpowiedzi na aktywację szlaku sygnałowego FGF (Greco i wsp., 2001). EVs mogą przenosić receptory, białka czy lipidy po połączeniu się z błoną komórek docelowych. Wyniki badań Rozmysłowicza i wsp. wykazały możliwość przekazywania za pośrednictwem EVs receptorów dla chemokin CXCR4 i CCR5 z limfocytów do innych komórek (Rozmysłowicz i wsp., 2003) oraz białek adhezyjnych pomiędzy płytkami krwi a komórkami hematopoetycznymi (Baj-Krzyworzeka i wsp., 2002).

Poprzez przenoszenie białek wewnątrzkomórkowych, EVs mogą modulować funkcje innych komórek. Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki pochodzące z MSCs izolowanych z krwi pępowinowej czy

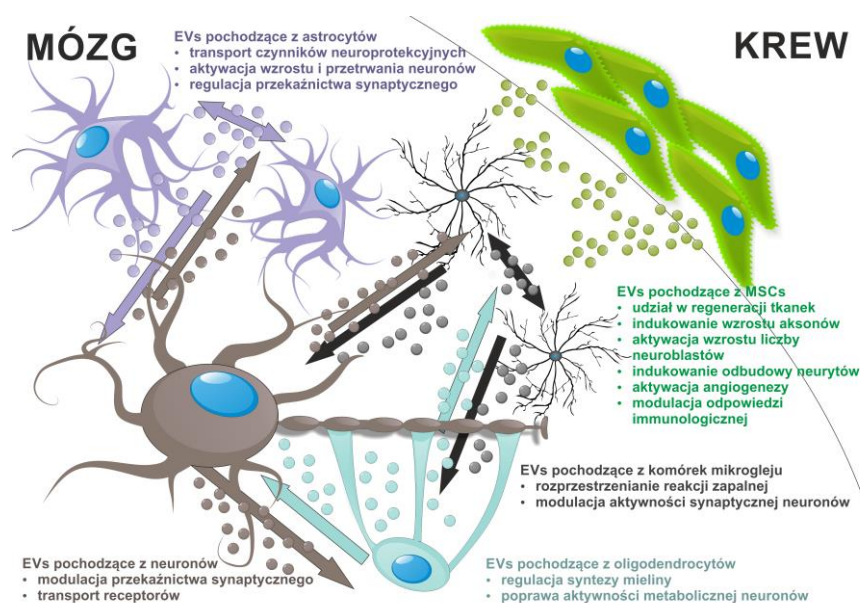
szpiku kostnego aktywują proces angiogenezy poprzez transport czynników proangiogennych, takich jak PDGF, VEGF, bFGF i leptyny (Bian i wsp., 2014; Chen i wsp., 2014). Mogą regulować apoptozę, EVs pochodzące z monocytów modulują ten proces poprzez przenoszenie kaspazy-1 (Sarkar i wsp., 2009). EVs mogą wywierać działanie protekcyjne poprzez przekazywanie lipidów. Badania Yuyama i wsp. wykazały, że glikosfingolipidy obecne w egzosomach wiążą β -amyloid, co przyczynia się do zmniejszenia uszkodzenia mózgu w modelu choroby Alzheimera u myszy (Yuyama i wsp., 2014). Inni autorzy zaobserwowali, że obecność β -amyloidu indukuje wydzielanie przez astrocyty EVs bogatych w C18 ceramidy, co aktywuje proces apoptozy (Wang i wsp., 2012). Grupa Grey'a wykazała, że gangliozydy GM1 i GM3 występujące w egzosomach pochodzących z komórek neuroblastomy przyczyniają się do agregacji α -synukleiny, białka występującego w rozwoju choroby Parkinsona (Grey i wsp., 2015).

Za biologiczne właściwości zewnątrzkomórkowych pęcherzyków są także odpowiedzialne zgromadzone w nich miRNA i mRNA. Doświadczenia Koh'a i wsp. wykazały, że w egzosomach izolowanych z ludzkich ESC-MSCs obecne są głównie miRNA z rodziny let-4, które hamują ekspresję jądrowego czynnika wątrobowego 4 α (HNF4 α) przyczyniając się do zachowania zdolności do samoodnowy komórek macierzystych (Koh i wsp., 2010). Opisano, że IGF-1R mRNA przekazywane za pośrednictwem egzosomów pochodzących z mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących ze szpiku kostnego (BM-MSCs) aktywują proces proliferacji komórek docelowych (Tomasoni i wsp., 2013). Większość mRNA występującego w EVs jest pofragmentowana, jednakże specyficzny rodzaj fragmentacji sprawia, że końce 3' mRNA mogą wiązać miRNA regulując w ten sposób stabilność, umiejscowienie i proces translacji mRNA w komórkach docelowych (Batagov i Kurochkin, 2013). EVs mogą przekazywać do innych komórek tRNA, rRNA i piwi-RNA, ale jak dotąd nie wiadomo, jakie działania może wywoływać taki transfer.

Z dotychczasowych badań wynika, że EVs odgrywają kluczową rolę w komunikacji pomiędzy komórkami ośrodkowego układu nerwowego. EVs wydzielane przez neurony, obecne zarówno w przestrzeni pre- jak i post-synaptycznej, mogą regulować aktywność synaps. Badania Kennedy i wsp. dowiodły, że w EVs wydzielanych przez neurony przenoszone są receptory synaptyczne AMPA, które są kluczowymi mediatorami szybkiego przekąźnictwa synaptycznego w OUN (Kennedy i wsp., 2006). Wykazano, że w zewnątrzkomórkowych pęcherzykach, pochodzących z astrocytów transportowane są czynniki, które mogą działać neuroprotekcyjnie, w tym mitochondrialne DNA, ATP, transportery glutaminanu, Hsp/Hsc70 i synapsyna-1, a także te, które pozytywnie wpływają na proces angiogenezy, takie jak FGF-2, VEGF, czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego siatkówki (PEDF) i endostatyna. EVs biorą udział w procesie różnicowania neuronów, modulacji przekąźnictwa synaptycznego i regulacji procesów degeneracyjnych (Frühbeis i wsp., 2013; Agnati i Fuxe, 2014). Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki produkowane przez komórki mikrogleju mogą przenosić czynniki, odgrywające dużą rolę w odpowiedzi immunologicznej, między innymi: IL-1 β , IL-6, indukowalną syntazę tlenu azotu (iNOS), cyklooksygenazę, przyczyniając się do rozprzestrzeniania reakcji „zapalnej” w mózgu (Verderio i wsp., 2012). Antonucci i wsp. wykazali, że EVs izolowane z komórek mikrogleju oddziałując z neuronami biorą udział w procesie pobudzenia przekąźnictwa synaptycznego (Antonucci i wsp., 2012). EVs oligodendrocytów mają pozytywny wpływ na aktywność metaboliczną neuronów poprzez przekazywanie licznych aktywnych biologicznie cząsteczek (Frühbeis i wsp., 2013). Opisano, że zewnątrzkomórkowe pęcherzyki uwalniane przez oligodendrocyty przenoszą białka mieliny, w tym białko proteolipidowe (PLP), peptyd natriuretyczny typu C (CNP), glikoproteinę związaną z mieliną (MAG) i glikoproteinę oligodendrocytów (MOG), uczestnicząc w tworzeniu osłonki mielinowej (Krämer-Albers i wsp., 2007).

EVs pochodzące z mezenchymalnych komórek macierzystych wykazują właściwości protekcyjne i regeneracyjne. Bruno i wsp. udowodnili, że mikropęcherzyki izolowane z ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego (hBM-MSCs) wspomagają przeżycie komórek nabłonkowych w ostrej niewydolności nerek, stymulując ich proliferację i zapobiegając apoptozie (Bruno i wsp., 2009). Podobnie, egzosomy otrzymywane z mezenchymalnych komórek macierzystych działają protekcyjnie na komórki mięśnia sercowego uszkodzonego w wyniku ostrego zawału serca (Lai i wsp., 2011). Działanie cytoprotekcyjne EVs pochodzących z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSCs) na komórki mięśnia sercowego wykazali również Adamiak i wsp. (Adamiak i wsp., 2018). Herrera i wsp. dowiedli, iż mikropęcherzyki pochodzące z ludzkich komórek macierzystych wątroby stymulują regenerację hepatocytów, a mechanizmem za to odpowiedzialnym jest transport horyzontalny mRNA (Herrera i wsp., 2010).

Z nielicznych jak dotąd badań wynika, że zewnątrzkomórkowe pęcherzyki produkowane przez MSCs, przeszczepione do ośrodkowego układu nerwowego mogą wykazywać działanie neuroprotekcyjne i regeneracyjne. Dotychczasowe doświadczenia wykazały, że EVs izolowane z MSCs przyczyniają się do wzrostu liczby aksonów i neuroblastów oraz indukują przebudowę neurytów (Lopez-Verrilli i wsp., 2016; Xin i wsp., 2012; Xin i wsp., 2013a). Ponadto, EVs uwalniane z MSCs aktywują proces angiogenezy, modulują odpowiedź immunologiczną i biorą udział w odbudowie uszkodzonych tkanek OUN (Budoni i wsp., 2013; Mokarizadeh i wsp., 2012; Xin i wsp., 2013b).



Ryc. 4. Schemat przedstawia współdziałanie komórek OUN za pośrednictwem uwalnianych z nich EVs oraz możliwości działania EVs pochodzących z MSCs na regenerację układu nerwowego.

1.4.5. Immunomodulacyjne funkcje EVs

W zależności od źródła komórek, z których pochodzą i sygnałów płynących z mikrośrodowiska, zewnątrzkomórkowe pęcherzyki mogą aktywować lub hamować reakcje odpowiedzi immunologicznej. Liczne doświadczenia wykazały, że EVs ułatwiają przeżycie przeszczepu, wyciszają odpowiedź immunologiczną w zwierzęcych modelach zapalenia stawów,

nieswoistego zapalenia jelit i wstrząsu septycznego (Kim i wsp., 2005b; Miksa i wsp., 2009; Pêche i wsp., 2003; Yang i wsp., 2010b).

Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki wyizolowane z komórek dendrytycznych mogą modyfikować przebieg reakcji zapalnych, w zależności od stopnia dojrzałości komórek, z których pochodzą. EVs izolowane z dojrzałych DCs zawierają antygeny, białka MHC, a także cząsteczki kostymulujące i mają zdolność do prezentacji antygenów limfocytom T oraz przenoszenia białek MHC klasy II i antygenów na naiwne komórki dendrytyczne, aktywując odpowiedź immunologiczną (Théry i wsp., 2002). Uczulanie DCs specyficznymi antygenami prowadzi do produkcji EVs, które mogą aktywować odpowiedź humoralną przeciwko tym antygenom, stymulując limfocyty B i produkcję przeciwciał (Qazi i wsp., 2009). Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki pochodzące z komórek dendrytycznych mogą także zwiększać aktywność i proliferację komórek NK (Viaud i wsp., 2009). Z kolei, EVs produkowane przez niedojrzałe komórki dendrytyczne mogą hamować reakcje zapalne.

Makrofagi zainfekowane przez patogeny, takie jak *Mycobacterium* czy *Toxoplasma* produkują egzosomy zawierające czynniki prozapalne, które stymulują wydzielanie cytokin prozapalnych przez inne makrofagi. (Bhatnagar i Schorey, 2007). EVs pochodzące z fibroblastów, pobranych z płynu maziowego pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów zawierały TNF- α , wydaje się, że jego działanie miało pozytywny efekt na przeżycie limfocytów T obserwowane w badaniach grupy Zhang'a (Zhang i wsp., 2006). Z kolei egzosomy wyizolowane z płynu oskrzelowo-pęcherzykowego chorych na sarkoidozę aktywowały produkcję cytokin prozapalnych przez komórki nabłonkowe (Qazi i wsp., 2010).

Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki wyizolowane z limfocytów T mogą ograniczać reakcje zapalne. Badania wykazały, że egzosomy pochodzące z limfocytów T zawierają ligand Fas (FasL), który indukuje apoptozę innych limfocytów T i umożliwia regulację odpowiedzi immunologicznej (Monleón i wsp., 2001). Z kolei EVs uwalniane z łożyska zmniejszają ekspresję CD3 ζ limfocytów T i obniżają cytotoksyczność komórek NK i limfocytów T cytotoksycznych, biorąc tym samym udział w zapewnieniu tolerancji matki na płód (Hedlund i wsp., 2009; Taylor i wsp., 2006).

W dotychczasowych badaniach wykazano, że zewnątrzkomórkowe pęcherzyki wyizolowane z komórek nowotworowych działają immunostymulująco lub immunosupresyjnie. Poprzez przenoszenie antygenów nowotworowych na komórki dendrytyczne, EVs mogą stymulować reakcje zapalne, w tym aktywację limfocytów T, w szczególności limfocytów T cytotoksycznych (Wolfers i wsp., 2001). EVs pochodzące z komórek nowotworowych mogą także hamować odpowiedź immunologiczną, indukują apoptozę limfocytów T dzięki przeniesieniu FasL i galektyny-9, hamują proliferację limfocytów T cytotoksycznych, aktywują tworzenie limfocytów T regulatorowych, obniżają działanie cytotoksyczne komórek NK (Koniusz i wsp., 2016). Mechanizm decydujący o aktywacji właściwości immunostymulujących lub immunosupresyjnych EVs uwalnianych z komórek nowotworowych nie został jak dotąd wyjaśniony.

Immunomodulacyjne właściwości mezenchymalnych komórek macierzystych, będące przedmiotem wielu badań *in vitro* i *in vivo* wydają się być związane z wydzielanymi przez komórki zewnątrzkomórkowymi pęcherzykami. Wykazano, że EVs uwalniane z MSCs mają zdolność hamowania proliferacji i różnicowania limfocytów B, a ich działanie jest dawkozależne (Budoni i wsp., 2013). Podobnie wykazano zależne od dawki zahamowanie produkcji immunoglobulin IgM, IgG i IgA przez zewnątrzkomórkowe pęcherzyki pochodzące z komórek mezenchymalnych. Mokarizadeh i wsp. zaobserwowali, że EVs produkowane przez BM-MSCs myszy mają zdolność hamowania proliferacji syngenicznych i allogenicznych limfocytów T, indukowania apoptozy aktywowanych limfocytów T, wzrostu liczby limfocytów T regulatorowych oraz zwiększonego wydzielania cytokin przeciwzapalnych: IL-10 i TGF- β 1 (Mokarizadeh i wsp., 2012).

Badania innych autorów dowiodły, że na powierzchni EVs pochodzących z MSCs były obecne galektyna-1 i ligand receptora programowanej śmierci (PD-L1), cząsteczki obecne także na MSCs (Garín i wsp., 2007; Kilpinen i wsp., 2013). Wykazano, że galektyna-1, która jest endogenną leptyną, indukuje apoptozę aktywowanych limfocytów T i stymuluje dojrzewanie limfocytów T regulatorowych (Blois i wsp., 2007; Rabinovich i wsp., 2000). Natomiast PD-L1, który jest ligandem receptora PD-1, indukuje proliferację i aktywność limfocytów T regulatorowych. Ponadto EVs pochodzące z mezenchymalnych komórek macierzystych zawierały TGF- β , który również aktywuje powstawanie limfocytów T regulatorowych (Chen i wsp., 2003).

Wyniki otrzymane w doświadczeniach *in vitro* zostały potwierdzone poprzez badania *in vivo*. Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki izolowane z MSCs zastosowane w modelu nieswoistego zapalenia jelit u myszy spowodowały zahamowanie produkcji cytokin prozapalnych, ograniczenie ubytku masy ciała zwierząt, obniżenie wskaźnika aktywności choroby w porównaniu do zwierząt kontrolnych (Del Fattore i wsp., 2014). W pracach zespołu Zhang'a wykazano, że u szczurów z upośledzeniem poznawczym po traumatycznym uszkodzeniu mózgu, po podaniu EVs pochodzących z MSCs obserwowano ograniczenie reakcji zapalnej w mózgu (Zhang i wsp., 2015b). Kordelas i wsp. sugerują, iż zewnątrzkomórkowe pęcherzyki pochodzące z MSCs poprzez hamowanie wydzielania cytokin prozapalnych i inhibicję działania komórek NK, mogą zostać wykorzystane w terapii pacjentów z oporną na steroidy chorobą przeszczep przeciwko gospodarzowi (GVHD) (Kordelas i wsp., 2014).

Powyższe wyniki badań sugerują, iż zewnątrzkomórkowe pęcherzyki wykazują podobne właściwości immunomodulacyjne jak mezenchymalne komórki macierzyste.

1.5. Próby terapii eksperymentalnej w ischemii mózgu z zastosowaniem MSCs i EVs

Próby zastosowania mezenchymalnych komórek macierzystych w terapiach ischemii mózgu wykorzystują różne mechanizmy ich działania. Do najważniejszych z nich należą takie właściwości MSCs, jak zastępowanie obumarłych komórek, neuroprotekcja, immunomodulacja, stymulacja tworzenia nowych synaps oraz aktywacja neurogenezy, astrogenezy, oligodendrogenezy i angiogenezy w uszkodzonych regionach mózgu. Z dotychczasowych badań wynika, że terapeutyczny efekt jest związany głównie z oddziaływaniem sekretom MSCs na endogenne komórki macierzyste i mikrośrodowisko gospodarza, w mniejszym stopniu z bezpośrednim przekształcaniem MSCs w komórki neuralne (Dulamea, 2015; Gervois i wsp., 2016).

1.5.1. Zastosowanie MSCs w terapii ischemii mózgu

Wyniki badań eksperymentalnych w modelach niedokrwienia OUN, prowadzonych zarówno *in vitro* jak i *in vivo* wykazały, że nawet krótkotrwała obecność MSCs powoduje pozytywny efekt w stosunku do komórek nerwowych w miejscu uszkodzenia i ograniczenie niekorzystnych z punktu regeneracji procesów „zapalnych”.

W badaniach ischemii mózgu prowadzonych *in vitro* wykorzystuje się modele ekscytotoksyczności indukowanej hipoksją i glutaminianem oraz deprywacji tlenu i glukozy (OGD). Prace Huanga i wsp. wykazały, że współhodowla MSCs z neuralnymi komórkami linii N17 poddanymi wcześniej deprywacji tlenu i glukozy przywraca obniżoną na skutek OGD proliferację komórek N17 i ogranicza ich apoptozę a także zmniejsza poziom TNF- α , co dowodzi protekcyjnego działania MSCs na uszkodzone neurony i działanie „przeciwzapalne” (Huang i wsp., 2014).

Doświadczenia przeprowadzone z użyciem neuronów czy komórek neuroblastoma pokazały, że MSCs zmniejszają obumieranie tych komórek spowodowane ischemią zarówno w eksperymentach ze współhodowlami komórek jak i z zastosowaniem nadsączy z hodowli MSCs, wskazując

na neuroprotektoryjne właściwości mezenchymalnych komórek macierzystych (Egashira i wsp., 2012; Scheibe i wsp., 2012a).

W badaniach innych autorów z wykorzystaniem eksplantów rdzenia kręgowego myszy, pierwotnych hodowli zwojów siatkówki czy neuronów mózgu udowodniono, że obecność MSCs indukuje wzrost neurytów w zwojach rdzeniowych (DRG), przeżycie komórek zwojowych siatkówki (RGCs) oraz przeżycie neuronów korowych i dopaminergicznych (Crigler i wsp, 2006; Mead i wsp, 2014; Gervois i wsp., 2016). Wydaje się, że te procesy są regulowane przez czynniki neurotroficzne wydzielane przez MSCs, takie jak NT-3, NGF, czy BDNF, których obecność została potwierdzona na poziomie ekspresji genów w MSCs jak i obecności tych białek w supernatantach współhodowli.

Pozytywne efekty MSCs wykazali Hung i wsp. stosując nadsącz z hodowli MSCs dodawany do pierwotnej hodowli ludzkich komórek śródbłonna izolowanych z aorty. Okazało się, że dodanie nadsączu z MSCs do komórek endotelialnych, uszkodzonych w wyniku ischemii, zwiększa ich przeżycie, ogranicza apoptozę, a także stymuluje proces angiogenezy (Hung i wsp., 2007). Zwiększony poziom czynników VEGF i MCP-1 pochodzenia MSCs w kondycjonowanym podłożu był prawdopodobnie odpowiedzialny za efekt antyapoptotyczny i angiogeny.

Wyniki działania mezenchymalnych komórek macierzystych otrzymane w doświadczeniach *in vitro* zostały zweryfikowane w eksperymentach *in vivo* z wykorzystaniem modeli zwierzęcych. W celu oceny terapeutycznych właściwości MSCs przeprowadzono szereg badań strukturalnych i funkcjonalnych oraz testów behawioralnych, z zastosowaniem licznych modeli eksperymentalnych, wielu rodzajów MSCs i różnych dróg przeszczepu.

Częstym sposobem transplantacji komórek w uszkodzeniu ischemicznym mózgu jest przeszczep domózgowy. Jako jedni z pierwszych Zhao i wsp. wykazali, że hBM-MSCs podane do kory mózgowej szczura migrowały do obszaru uszkodzenia, były zdolne do przeżycia w mózgu gospodarza, różnicowały się w dojrzałe neurony oraz wspomagały przywrócenie utraconych funkcji, co zostało potwierdzone w testach behawioralnych (Zhao i wsp., 2002).

W badaniach innych autorów zaobserwowano, że MSCs po transplantacji mogą przesłać się w komórki neuralne, wprawdzie częściej w komórki astrogleju niż w neurony, jednak nie stwierdzono ich migracji, ani dalszego różnicowania, wobec tego trudno przypuszczać, aby powstające z MSCs nowe komórki neuralne były odpowiedzialne za poprawę funkcjonalną zwierząt widoczną po przeszczepie (Leong i wsp., 2012; Liao i wsp., 2009; Yasuhara i wsp., 2009). Pozytywny efekt transplantacji był prawdopodobnie związany z parakrynnym działaniem MSCs. Ten efekt wykazano w pracach eksperymentalnych grup Liao i Lin, gdzie MSCs przeszczepione domózgowo w modelu udaru u szczurów, zwiększają aktywność neuronów, ograniczają obumieranie komórek, stymulują angiogenezę. Pozytywnym efektem transplantacji MSCs towarzyszył wzrost poziomu czynników wzrostu takich jak: BDNF, VEGF, bFGF i angiopoetyny-2 (Liao i wsp., 2009; Lin i wsp., 2011). Dodatkowo, MSCs przeszczepione domózgowo mogą modulować odpowiedź immunologiczną towarzyszącą niedokrwieniu mózgu. Produkowane przez nie czynniki, między innymi TGF- β hamują wydzielanie MCP-1 i ograniczają infiltrację komórek CD68⁺ do uszkodzonej tkanki (Yoo i wsp., 2013).

Przeszczep domózgowy MSCs jest procedurą inwazyjną, szczególnie traumatyczną dla pacjentów, dlatego coraz częściej przy transplantacji komórek stosuje się systemowe drogi ich podania. Najczęściej stosowaną drogą systemowego podania MSCs w modelu ischemii mózgu jest przeszczep dożylny.

Doświadczenia pokazały, że po dożylnym podaniu MSCs zwiększa się gęstość naczyń krwionośnych na obrzeżach uszkodzenia i ilość wydzielanych czynników proangiogeny i neurotroficznych takich, jak: BDNF, VEGF, bFGF, NGF, HGF, GDNF w mózgu biorców obserwuje się wzmożoną angiogenezę i neurogenezę (Dulamea, 2015). Po transplantacji MSCs

w modelu niedokrwienia mózgu u szczurów zauważono zwiększenie proliferacji progenitorów neuralnych w strefie okołokomorowej (SVZ), wzrost liczby oligodendrocytów, neurofilamentów i synaps, z jednoczesnym wzrostem poziomu synaptofizyny i VEGF (Gutiérrez-Fernández i wsp., 2013; Zhang i wsp., 2013). Badania z udziałem MSCs pochodzących z komórek embrionalnych wykazały, że przeszczepione dożylnie eMSCs migrują do obszaru niedokrwienia mózgu, a po jego zasiedleniu prezentują markery neuronalne i antygeny komórek śródbłonna, działając protekcyjnie na uszkodzone podczas niedokrwienia komórki neuralne (Liu i wsp., 2009). Z badań Lee i wsp. wynika, że MSCs podane dożylnie stymulują oddziaływanie SDF-1/CXCR4, co ma znaczenie w zasiedlaniu przez nie obszaru uszkodzenia (Lee i wsp., 2015). W niektórych eksperymentach, po dożylnym podaniu MSCs nie stwierdza się obecności komórek w uszkodzonych tkankach lub ich liczba jest bardzo mała, choć po przeszczepie MSCs obserwuje się poprawę funkcji upośledzonych w wyniku udaru.

Coraz liczniejsze badania eksperymentalne wykorzystują dotętniczą transplantację komórek w zwierzęcych modelach ischemii mózgu. W porównaniu do podania dożylnego, okazało się, że przeszczepione dotętniczo MSCs były obecne w korze mózgowej i na obrzeżach uszkodzenia, wykazywały ekspresję markerów astrocytów i neuronów, u zwierząt obserwowano szybszą poprawę funkcji neurologicznych (Ishizaka i wsp., 2013; Jiang i wsp., 2014; Shen i wsp., 2007). Inne prace udowodniły, że pomimo niewielkiej liczby MSCs widocznych w obszarze niedokrwienia mózgu po ich dotętniczej transplantacji, obserwowano zwiększony wzrost i remielinizację aksonów (Shen i wsp., 2006), zwiększenie produkcji BDNF, stymulację procesu angiogenezy z jednoczesnym obniżeniem aktywności komórek mikrogleju i spadkiem MMP-9 (Ishizaka i wsp., 2013). Korzystne efekty działania przeszczepionych dotętniczo MSCs w modelu ischemii mózgu, w tym zwiększona liczba aksonów obserwowano aż do jednego roku po transplantacji (Shen i wsp., 2007). Badania genetyczne ujawniły obecność egzogennych MSCs samców w mózgu samic, komórki te wykazywały markery astrocytów, neuronów i komórek endotelialnych. Przeszczepione komórki znaleziono również w innych narządach biorców. Próby dotętniczej transplantacji MSCs przeprowadzano również u dużych zwierząt. Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z ludzkiej krwi pępowinowej przeszczepione u psów w modelu ischemii mózgu obserwowano w rejonie niedokrwienia, gdzie wykazywały ekspresję markerów typowych dla neuronów i astrocytów, mRNA dla czynników BDNF i VEGF. Po transplantacji MSCs zanotowano mniejszy obszar uszkodzenia w porównaniu ze zwierzętami, które nie otrzymały przeszczepu i szybszą poprawę funkcji motorycznych upośledzonych w wyniku ischemii mózgu (Chung i wsp., 2009). Immunomodulacyjne działanie przeszczepionych dotętniczo MSCs wykazano w mózgu szczurów w modelu udaru, gdzie zanotowano statystycznie istotny spadek poziomu IL-2 mRNA i IL-6 mRNA (Karlupia i wsp., 2014). Jednocześnie, u biorców przeszczepu stwierdzono zmniejszenie obszaru lezji i redukcję objawów neurologicznych, spowodowanych epizodem niedokrwienia mózgu. Acosta i wsp. zaobserwowali, że BM-MSCs podane dożylnie w modelu przewlekłego udaru niedokrwienego mózgu migrują do śledziony. Spadek liczby komórek wykazujących antygeny MHC klasy II, obniżenie poziomu TNF- α świadczy o modulacji ogólnej odpowiedzi immunologicznej, której skutkiem może być obserwowana u szczurów 30% redukcja obszaru uszkodzenia (Acosta i wsp., 2015).

Terapeutyczne działanie mezenchymalnych komórek macierzystych w modelu ischemii mózgu zaobserwowano po ich podaniu donosowym. Wei i wsp. wykazali, że transplantacja prekondycjonowanych hipoksyjnie BM-MSCs ze zwiększoną ekspresją białek związanych z migracją, takich jak CXCR4, MMP-2 i MMP-9 powoduje efektywniejsze zasiedlanie uszkodzonej w wyniku ischemii tkanki przez przeszczepione MSCs, jednocześnie obserwuje się zwiększoną przeżywalność komórek gospodarza na obrzeżach lezji (Wei i wsp., 2013). Podanie donosowe może być także skuteczną i mało inwazyjną drogą transplantacji komórek u noworodków. Doświadczenia van

Velthoven'a i wsp. ujawniły, że po donosowym przeszczepie MSCs u osesków szczurów po ischemii, zwierzęta wykazują mniejszy obszar uszkodzenia, wzrost proliferacji progenitorów neuralnych w uszkodzonej półkuli, wyraźne granice istoty białej i szarej, szybsze przywrócenie funkcji ruchowych (van Velthoven i wsp., 2013). Ponadto, po podaniu BM-MSCs oseskom szczurów w modelu ischemii mózgu obserwuje się wzrost angiogenezy, szybszą odbudowę jednostki neurowaskularnej, poprawę przepływu krwi w korze mózgowej oraz powrót funkcji czuciowo-ruchowych i węchowych (Wei i wsp., 2015).

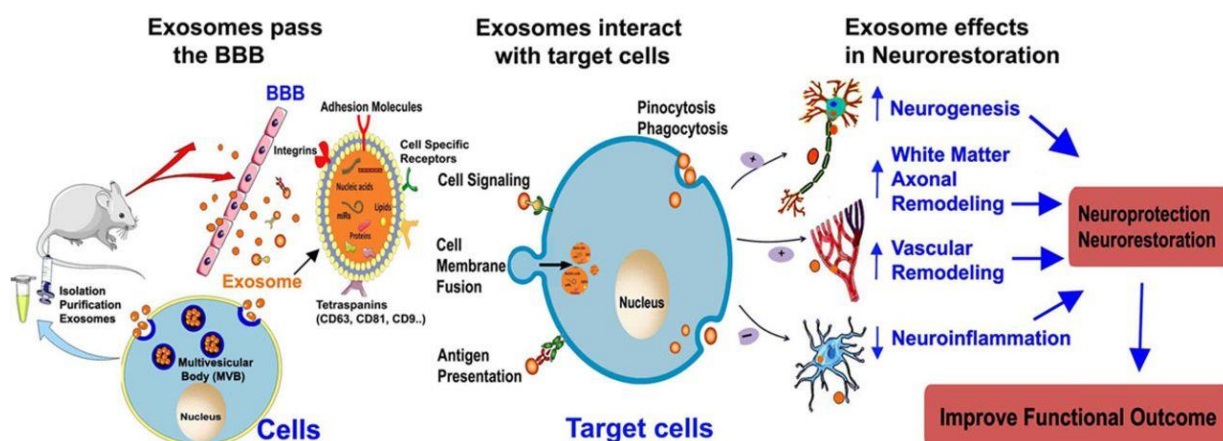
Przedmiotem badań są także zmodyfikowane genetycznie MSCs. Celem transfekcji komórek jest najczęściej zwiększenie ilości czynników wzrostu, które mogą być dostarczone do miejsca uszkodzenia lub wzmocnienia efektu terapeutycznego. Velthoven i wsp. wykazali, że MSCs z nadekspresją BDNF przeszczepione w modelu ischemii u osesków szczurów znacząco poprawiają ich upośledzone na skutek niedokrwienia zdolności ruchowe (van Velthoven i wsp., 2013). Zastosowanie przez Kurozumi i wsp. zmodyfikowanych MSCs poprzez ich transfekcję wektorem adenowirusowym zawierającym BDNF lub GDNF skutkowało zmniejszeniem obszaru uszkodzenia mózgu i mniejszym deficytem funkcjonalnym powstałym po udarze niedokrwinnym w porównaniu do zwierząt kontrolnych, którym przeszczepiano natywne MSCs (Kurozumi i wsp., 2005). Wykorzystanie MSCs z nadekspresją czynników angiogennych takich jak VEGF czy angiopoetyna 1 w terapii szczurów po ischemii mózgu dawało pozytywne rezultaty u biorców w postaci redukcji obszaru martwicy niedokrwiennej (Miki i wsp., 2007; Onda i wsp., 2008).

1.5.2. Zastosowanie EVs w terapii ischemii mózgu

Badania ostatnich lat ujawniły, że za efekt terapeutyczny mezenchymalnych komórek macierzystych związany z ich właściwościami parakrynnymi odpowiedzialne są uwalniane z komórek pęcherzyki. Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki zawierające receptory błonowe oraz białka, lipidy, kwasy nukleinowe i różne formy RNA mogą być wykorzystane w leczeniu różnych schorzeń zamiast transplantacji komórek, wywołując podobny efekt.

Do największych zalet zastosowania zewnątrzkomórkowych pęcherzyków należą: (1) niska immunogenność; (2) mniejsze ryzyko zablokowania naczyń i wystąpienia zakrzepicy mikronaczyniowej; (3) zdolność do przekraczania bariery krew-mózg po transplantacji systemowej; (4) łatwość stworzenia wielkoskalowej produkcji EVs zmodyfikowanych genetycznie; (5) wyższy stosunek powierzchni do objętości i związane z tym silniejsze przenoszenie aktywnych cząstek do tkanek docelowych; (6) łatwe modyfikacje genetyczne miRNA zawartego w EVs. Efekt terapeutyczny egzosomów i mikropęcherzyków w ischemii mózgu może dotyczyć modulacji szeregu procesów, między innymi: indukcji neurogenezy, aktywacji angiogenezy, hamowania apoptozy, modulacji odpowiedzi immunologicznej oraz przeprogramowania komórek (Chen i Chopp, 2018).

Badania *in vitro* z wykorzystaniem hodowli neuronów korowych wykazały, że egzosomy wyizolowane z MSCs stymulują wzrost komórek nerwowych (Zhang i wsp., 2017). EVs zawarte w supernatantach pochodzących z hodowli MSCs działają neuroprotekcynnie zwiększając przeżycie neuronów, a także stymulując regenerację komórek neuralnych po uszkodzeniu w modelu ekscytotoksyczności indukowanej glutaminianem (Hao i wsp., 2014). Lin i wsp. dowiedli, że mikropęcherzyki wyizolowane z MSCs zabezpieczały szczurze komórki PC12 przed uszkodzeniem wywołanym działaniem glutaminianu na drodze aktywacji szlaku PI3K/Akt (Lin i wsp., 2014). Eksperymenty innej grupy badaczy pokazały, że egzosomy pochodzące z MSCs izolowanych z tłuszczu powodują wzrost ekspresji kinazy białkowej CδII w unieśmiertelnionej linii mysich komórek hipokampa i indukują proliferację neuronów (El Bassit i wsp., 2017).



Ryc. 5. Możliwości działania egzosomów, zastosowanych w terapii eksperymentalnej ischemii mózgu (Chen i Chopp, 2018).

Ze względu na małe rozmiary i możliwość przekraczania bariery krew-mózg zewnątrzkomórkowe pęcherzyki często przeszczepiane są systemowo. W wyniku przeszczepu egzosomów pochodzących z MSCs u szczurów po 24 godzinach od wywołania ischemii mózgu stwierdzono aktywację procesów endogennej neurogenezy, wzrost liczby aksonów i poprawę upośledzonych w wyniku niedokrwienia funkcji życiowych zwierząt, (Xin i wsp., 2013a). Po podaniu EVs wyizolowanych z MSCs obserwowano długotrwałą neuroprotekcję i modulację obwodowej odpowiedzi immunologicznej (Doepner i wsp., 2015).

Podobnie, przeszczep EVs uwolnionych z MSCs w modelu ischemii mózgu u płodów owiec działał neuroprotekcynie. U zwierząt obserwowano zmniejszenie obszaru lezji i ogólną poprawę funkcji, upośledzonych w wyniku niedokrwienia, co stwarza nadzieję na zastosowanie tej formy terapii w leczeniu uszkodzeń hipoksyjno-ischemicznych mózgu u noworodków (Ophelders i wsp., 2016). W doświadczeniach Chen'a i wsp. okazało się, że egzosomy izolowane z MSCs pochodzących z tkanki tłuszczowej (AD-MSCs) mają podobne właściwości, jak te ze szpiku kostnego. Po ich podaniu, w 3 godziny po ischemii mózgu u szczurów, stwierdzono mniejszy obszar uszkodzenia, modulację odpowiedzi immunologicznej i poprawę funkcji neurologicznych (Chen i wsp., 2016). Otero-Ortega i wsp. wykazali, że przeszczepione dożylnie EVs w modelu podkorowego udaru u szczurów powodują poprawę przewodzenia sygnałów, wzrost aksonów i odbudowę istoty białej oraz ograniczenie deficytów motorycznych spowodowanych ischemią (Otero-Ortega i wsp., 2017).

Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki zastosowane w terapiach ischemii mózgu mają wpływ na proces angiogenezy. Xin i wsp. wykazali, że przeszczepione dożylnie egzosomy powodują zwiększenie ekspresji czynnika von Willendrandt (vWF) w obszarze uszkodzenia (Xin i wsp., 2013a). Wyniki innych autorów wskazują na aktywację długotrwałej angiogenezy w mózgu myszy po dożylniej transplantacji EVs pochodzących z MSCs (Doepner i wsp., 2015). Z kolei Chen i wsp. zaobserwowali zwiększoną obecność markerów związanych z angiogenezą, w tym CD31, vWF i VEGF oraz wzrost liczby małych naczyń w strefie uszkodzenia po dożylnym przeszczepie egzosomów izolowanych z AD-MSCs, co znacząco poprawiało przepływ krwi w tkance po ischemii mózgu (Chen i wsp., 2016).

Pozytywne efekty przeszczepiania EVs w modelach niedokrwienia mózgu obserwowano także z zastosowaniem zewnątrzkomórkowych pęcherzyków pochodzących z innych niż MSCs typów komórek. Hayon i wsp. zastosowali w swoich badaniach mikropęcherzyki wyizolowane z płytek krwi. Po ich dożylniej transplantacji stwierdzono zwiększenie proliferacji endogennych komórek neuralnych, i wzrost angiogenezy oraz poprawę ogólnych funkcji ruchowych i poznawczych u szczurów po udarze niedokrwinnym (Hayon i wsp., 2012a). Mikropęcherzyki z płytek krwi zawierają czynniki wzrostu

stymulujące namnażanie neuralnych komórek progenitorowych i odbudowę jednostki neurowaskularnej, co może być wykorzystane w terapiach ischemii mózgu (Hayon, 2012a; Hayon i wsp., 2012b). Ponadto wykazano, że sekretom apoptotycznych komórek jednojądrzastych izolowanych z krwi obwodowej zdrowych dawców podany szczurom po udarze niedokrwiennym ma działanie neuroprotektoryjne, redukuje uszkodzenie mózgu i przywraca upośledzone w wyniku ischemii mózgu funkcje neurologiczne (Altmann i wsp., 2014).

Jednym z głównych mechanizmów odpowiedzialnych za terapeutyczne właściwości EVs w ischemii mózgu jest transfer miRNA pomiędzy komórkami. Doświadczenia *in vitro* wykazały, że egzosomy pochodzące z MSCs stymulują wzrost aksonów poprzez proces, w który zaangażowane jest miRNA (Zhang i wsp., 2017). Badania eksperymentalne *in vivo* potwierdziły te obserwacje. Systemowo podane egzosomy pochodzące z MSCs modulowały potranskrypcyjną regulację genów i ekspresję białek w komórkach docelowych biorców, przyczyniając się do szybszej poprawy funkcji neurologicznych u zwierząt po udarze niedokrwiennym. Wykazano, że w procesy te zaangażowane są różne rodzaje miRNA, między innymi miR-133b (Xin i wsp., 2012). Xin i współpracownicy ujawnili, że egzosomy pochodzące z MSCs z nadekspresją mi-R-133b silniej wzmagają plastyczność mózgu i powrót utraconych funkcji w modelu udaru niż egzosomy z komórek kontrolnych (Xin i wsp., 2017a). Autorzy ci wykazali również, że egzosomy izolowane z MSCs wzbogacone o miRNA-17-92 znacząco poprawiają funkcje neurologiczne, wzmacniają procesy neurogenezy, oligodendrocytozy i zwiększają plastyczność dendrytów u szczurów po ischemii mózgu w porównaniu z egzosomami pozbawionymi dodatkowego miRNA (Xin i wsp., 2017b).

Ponadto doświadczenia Chen i Chop wykazały, że egzosomy pochodzące z MSCs stymulują komórki endogenne mózgu do produkcji miRNA, wpływając na plastyczność mózgu po ischemii (Chen i Chopp, 2018). Badania prowadzone z wykorzystaniem modelu OGD udowodniły, że egzosomy pochodzące z astrocytów poddanych działaniu egzosomów izolowanych z MSCs z nadekspresją miR-133b znacząco zwiększają wzrost neurytów w hodowlach pierwotnych neuronów korowych w porównaniu z egzosomami pochodzącymi z komórek kontrolnych (Xin i wsp., 2017a). Podobnie Huang i współpracownicy dowiedli, że wzrost ilości miR-124-3p w egzosomach z komórek mikrogleju aktywuje polaryzację tych komórek w kierunku fenotypu przeciwzapalnego, hamuje reakcje prozapalne i indukuje odbudowę uszkodzonych neuronów (Huang i wsp., 2018).

Obecnie przeprowadzane są także próby terapii eksperymentalnych z wykorzystaniem innych modyfikacji EVs. Kalani i współpracownicy wykazali, że przeszczepione donosowo egzosomy pochodzące z embrionalnych komórek macierzystych zamknięte w kapsułach kurkuminy zmniejszyły aktywację astrocytów, zwiększając ekspresję białka jądrowego specyficznego dla dojrzałych neuronów (NeuN) oraz białek połączeń ścisłych śródbłonna w modelu udaru niedokrwiennego u myszy (Kalani i wsp., 2016).

1.6. Próby terapii klinicznej w ischemii mózgu z zastosowaniem MSCs

W 2007 roku na spotkaniu naukowców, przedstawicieli firm i członków Narodowych Instytutów Zdrowia noszącym nazwę „Terapie Komórek Macierzystych jako Kształujący się Paradygmat w Udarze (STEPS)” ustalono zasady postępowania w celu wykorzystania mezenchymalnych komórek macierzystych w badaniach klinicznych udaru mózgu. Przed przeniesieniem badań eksperymentalnych do fazy klinicznej należy rozwiązać problemy natury etycznej, technicznej i medycznej. Z etycznego punktu widzenia zastosowanie MSCs jest bardziej zasadne niż użycie embrionalnych komórek macierzystych obciążonych większym ryzykiem transformacji nowotworowej. Problemy techniczne związane są z ustaleniem odpowiedniego czasu potrzebnego na izolację, hodowlę i charakterystykę MSCs, wykonanie testów bakteriologicznych

i namnożenie komórek, czas ten powinien wynosić od 3 do 5 tygodni. Należy też ustalić drogę transplantacji MSCs, podanie domózgowe przynosi korzystne efekty, jednak jest bardziej inwazyjne niż systemowy przeszczep komórek. Kolejny problem stanowi wybranie odpowiedniego czasu pomiędzy udarem a podaniem MSCs, a także właściwej liczby komórek oraz częstotliwości podań. Ze strony medycznej należy potwierdzić brak oddziaływania MSCs na inne choroby pacjenta i przyjmowane przez niego leki oraz wykazać zasadność zastosowania komórek zmodyfikowanych genetycznie (Dulamea, 2015).

Pomimo tych trudności, korzystne wyniki otrzymane w badaniach eksperymentalnych prowadzonych na zwierzętach uzasadniają stosowność ich przeniesienia do fazy klinicznej i zastosowania u pacjentów po ischemii mózgu. Jak dotąd przeprowadzono 20 terapii klinicznych z wykorzystaniem MSCs u chorych po udarze, z czego tylko 2 badania dotyczyły udaru krwotocznego, a 13 prób samego udaru niedokrwiennego (<https://clinicaltrials.gov/>). W większości badań zastosowano mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego podawane systemowo.

Jedną z pierwszych prób klinicznych fazy I/II przeprowadzili Bang i wsp., przeszczepiając autologiczne BM-MSCs dożylnie, dwukrotnie w ciągu 9 tygodni od wystąpieniu udaru niedokrwiennego. Badanie obejmowało 5 pacjentów poddanych transplantacji MSCs i 25 pacjentów kontrolnych, zaś całkowita dawka podanych komórek wynosiła 1×10^8 BM-MSCs. W grupie chorych po przeszczepie BM-MSCs nie stwierdzono zgonów bezpośrednio spowodowanych transplantacją komórek, ponownego wystąpienia udaru ani działań nieporządkanych po przeszczepie, natomiast zauważono znaczącą poprawę Indeksu Barthela w porównaniu z pacjentami kontrolnymi w ciągu 1 roku obserwacji (Bang i wsp., 2005).

Lee i wsp. wykonali 5-letnie badania kliniczne z dwukrotnym podaniem dożylnym autologicznych BM-MSCs u 85 chorych po udarze niedokrwiennym. W grupie po przeszczepie MSCs obserwowano dłuższą przeżywalność pacjentów u 72% chorych w stosunku do grupy kontrolnej (34% chorych), wzrost współczynnika w Skali Rankina, brak znaczących efektów ubocznych. Poprawę stanu klinicznego u pacjentów, którzy otrzymali przeszczep MSCs towarzyszyło podwyższenie poziomu SDF-1 we krwi oraz mniejszy stopień uszkodzenia strefy podziarnistej komór bocznych (Lee i wsp., 2010).

Bhasin i wsp. przeprowadzili 2 próby terapii z zastosowaniem dożylniej transplantacji BM-MSCs w chronicznym udarze niedokrwiennym i w udarze krwotocznym. W pierwszym badaniu brało udział 12 pacjentów, w tym 6 z nich otrzymało przeszczep $50-60 \times 10^6$ komórek, a obserwacja trwała 24 tygodnie. W grupie chorych nie stwierdzono zgonów ani znaczących efektów ubocznych, zarejestrowano natomiast niewielki wzrost indeksu Fugl Meyer i zmodyfikowanego indeksu Barthela oraz wzrost aktywacji pól Brodman BA4 i BA6 świadczących o zwiększonej neuroplastyczności u pacjentów, którym podano BM-MSCs (Bhasin i wsp., 2011). Drugie badanie kliniczne wykonane było według tej samej procedury, liczbę pacjentów zwiększono do 40 osób. W tej grupie chorych również nie zaobserwowano efektów ubocznych czy zgonów spowodowanych przeszczepem komórek. Spośród wszystkich testowanych parametrów stwierdzono jedynie istotny statystycznie wzrost zmodyfikowanego indeksu Barthela (Bhasin i wsp., 2013).

Honmou i współpracownicy przeprowadzili próbę kliniczną u 12 pacjentów z uszkodzeniami istoty białej i szarej, wynikające z przebytego udaru niedokrwiennego. Wszystkim chorym podano dożylnie $0,6-1,6 \times 10^8$ autologicznych BM-MSCs w okresie od 36 do 133 dni od wystąpienia ischemii mózgu. Nie zaobserwowano niekorzystnego działania przeszczepionych komórek, u pacjentów po transplantacji MSCs widoczne było ograniczenie obszaru uszkodzenia, o co najmniej 20% w ciągu jednego tygodnia od transplantacji BM-MSCs (Honmou i wsp., 2011).

Savitz i wsp. podawali dożylnie 85×10^6 komórek jednojądrzastych pochodzących ze szpiku kostnego (BM-MNCs) 11 pacjentom w okresie od 7 do 30 dni od wystąpienia udaru mózgu. Infuzja komórek była przeprowadzona w przeciągu 4 godzin od aspiracji szpiku kostnego. Nie stwierdzono efektów ubocznych, zaobserwowano natomiast istotną statystycznie poprawę współczynników: Skali Udarowej Narodowego Instytutu Zdrowia (NIHSS), indeksu Barthela i zmodyfikowanego indeksu Skali Rankina (Savitz i wsp., 2011).

W ostatnich latach Hess i wsp. przeprowadzili randomizowaną, podwójnie zaślepioną próbę kliniczną fazy II, z zastosowaniem kontroli placebo, u chorych, u których wystąpił udar niedokrwienny w przeciągu 24-48 godzin od epizodu niedokrwienia. Badanie przeprowadzono u 129 pacjentów, z czego 67 chorym podano dożylnie multipotentjalne dojrzałe progenitory komórek szpiku kostnego, komercyjnie dostępne, otrzymane z firmy Lonza, a 62 osoby otrzymały preparat placebo. W ciągu 90 dni badań nie zaobserwowano wystąpienia efektów ubocznych, nie stwierdzono jednak znaczącej poprawy funkcjonalnej w grupie chorych, którym podano komórki w stosunku do chorych, którzy otrzymywali placebo (Hess i wsp., 2017).

Suarez-Monteagudo i wsp. wykonali próbę kliniczną ze stereotaktycznym podaniem komórek 5 pacjentom po udarze niedokrwiennym i krwotocznym, u których występowały lezje wzgórza, prążkowiec i pierwszorzędowej kory ruchowej. Chorym przeszczepiono do mózgu od $17,3 \times 10^6$ do 55×10^6 autologicznych BM-MNCs. W ciągu 1 roku obserwacji u wszystkich pacjentów po transplantacji MNCs stwierdzono niewielką poprawę funkcjonalną, nie obserwowano efektów ubocznych (Suárez-Monteagudo i wsp., 2009).

Obecnie przeprowadza się coraz więcej prób klinicznych, w których komórki podawane są drogą dotętniczą. Barbosa da Fonseca i wsp. wykonali próbę kliniczną u 6 pacjentów, u których wystąpił udar niedokrwienny 59-82 dni wcześniej. Chorym przeszczepiano dotętniczo $1,25-5 \times 10^8$ autologicznych komórek jednojądrzastych szpiku kostnego, z czego 2×10^7 komórek była wyznakowana ^{99m}Tc . Wykazano, że BM-MNCs były obecne w mózgu do 24 godzin od momentu podania, ponadto obserwowano je w wątrobie, płucach, śledzionie, nerkach i pęcherzu moczowym. Nie stwierdzono działań nieporządkanych ani niekorzystnego działania znacznika po 120 dniach analizy (Barbosa da Fonseca i wsp., 2010). Podobnie bezpieczeństwo stosowanej terapii zostało potwierdzone przez Battistella i wsp. Autorzy podawali dotętniczo $1-5 \times 10^8$ autologicznych BM-MNCs sześciu pacjentom. Podczas 180 dni obserwacji, prowadzonych u chorych, którzy otrzymali przeszczep komórek nie zaobserwowali objawów ubocznych (Battistella i wsp., 2011).

Ghali i wsp. przeprowadzili próbę kliniczną u 39 pacjentów w fazie podostrej ischemii mózgu, 21 z nich podano dotętniczo autologiczne komórki jednojądrzaste pochodzące ze szpiku kostnego, 18 osób stanowiło grupę kontrolną. Przeszczep BM-MNCs nie wywołał żadnych znaczących działań nieporządkanych, ale u tych chorych nie obserwowano istotnej poprawy zdolności motorycznych, redukcji zaburzeń mowy czy zmniejszenia obszaru uszkodzenia mózgu w porównaniu z grupą kontrolną (Ghali i wsp., 2016).

Friedrich i wsp. wykonali dotętniczą infuzję BM-MNCs u 20 chorych, we wczesnej fazie po udarze (3-7 dni). Po przeszczepie komórek obserwowano poprawę zmodyfikowanego współczynnika Skali Rankina u 30% pacjentów po 90 dniach obserwacji, u kolejnych 40% osób zanotowano ogólną poprawę stanu zdrowia. Nie stwierdzono szkodliwego działania zabiegu transplantacji (Friedrich i wsp., 2012).

Moniche i wsp. przeprowadzili badanie kliniczne fazy I/II metodą pojedynczo ślepej próby w grupie 20 pacjentów. Po upływie od 5 do 9 dni po niedokrwieniu podawano $1,59 \times 10^8$ autologicznych BM-MNCs drogą dotętniczą. Nie zaobserwowano żadnych efektów ubocznych po upływie 6 miesięcy od transplantacji (Moniche i wsp., 2012).

Jiang i współpracownicy wykonali próbę kliniczną u 4 chorych, wśród których trzy osoby przeszły udar niedokrwienny, a jedna udar krwotoczny. Badacze przeszczepili mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze sznura pępowinowego (UC-MSCs) podając 2×10^7 UC-MSCs do tętnicy środkowej mózgu pacjentów. Nie zaobserwowano działań nieporządkanych po upływie 6 miesięcy. Dwóch z trzech pacjentów po ischemii mózgu i transplantacji UC-MSCs wykazywało zwiększoną siłę mięśni oraz poprawę zmodyfikowanego współczynnika Skali Rankina w ocenie przeprowadzonej po 90 i 180 dniach od przeszczepu (Jiang i wsp., 2013).

Aby ocenić bezpieczeństwo transplantacji mezenchymalnych komórek macierzystych Lalu i wsp. przeprowadzili metaanalizę prób klinicznych, opublikowanych w MEDLINE, EMBASE i Centralnym Rejestrze Kontrolowanych Prób Cochrane'a do czerwca 2011 roku. Przeanalizowano wyniki badań u 1032 chorych, którym podawano wyłącznie MSCs lub w połączeniu z innymi komórkami we wlewach dożylnych lub dotętnicznych. Jednostkami chorobowymi były: udar niedokrwienny, choroba Crohna, kardiomiopatie, zawał serca, choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi. Spośród wszystkich prób klinicznych 8 stanowiło badania randomizowane z kontrolą (RCTs) obejmujące 321 pacjentów, obserwowanych po upływie 3 do 60 miesięcy od transplantacji. Metaanaliza RCTs wykazała brak efektów ubocznych po podaniu MSCs takich jak: ostra toksyczność spowodowana infuzją komórek, powikłania ogólnoustrojowe, infekcje, nowotwory czy śmierć, u niektórych chorych stwierdzono jedynie przemijającą gorączkę (Lalu i wsp., 2012). Dane te pokazują, że przeszczep MSCs jest bezpieczną metodą do zastosowań klinicznych.

Obecnie, ze względu na obiecujące wyniki otrzymywane w badaniach przedklinicznych, dużym zainteresowaniem z punktu zastosowań klinicznych cieszą się zewnątrzkomórkowe pęcherzyki i możliwość ich użycia w terapii ischemii mózgu. Do tej pory nie przeprowadzono żadnej próby klinicznej przeszczepiania EVs pacjentom po udarze niedokrwiennym, planowane jest jednak badanie obejmujące transplantację egzosomów wzbogaconych w miR-124 wyizolowanych z mezenchymalnych komórek macierzystych pacjentom w ostrej fazie po ischemii mózgu (<https://clinicaltrials.gov/>). Rosnące zainteresowanie terapią przy użyciu zewnątrzkomórkowych pęcherzyków zarówno ze strony naukowców, lekarzy, ale także firm farmaceutycznych stworzy w najbliższym czasie platformę do opracowania protokołów zastosowania EVs w próbach klinicznych.

2. Założenia i cel pracy

Niedokrwienie mózgu jest jednym z ważniejszych problemów klinicznych chorób ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Występujący w następstwie niedokrwienia zespół objawów określany mianem udaru powoduje wysoki wskaźnik śmiertelności chorych. Nagła śmierć komórek neuralnych w miejscu niedotlenienia i uwalnianie czynników związanych z uszkodzeniem tkanki stanowi istotę lokalnych reakcji immunologicznych w mózgu. Aktywacja astrocytów, komórek mikrogleju i napływ leukocytów z krwi przyczynia się do progresji schorzenia. Miejscowy proces „zapalny” wywołany zmianami w tkance powstałymi na skutek ischemii zwiększa obszar uszkodzenia.

Ograniczone możliwości terapii sprawiają, iż poszukiwanie nowych metod leczenia skutków udaru prowadzi się wielokierunkowo, wykorzystując różne elementy patofizjologii, w tym komórki immunologicznie czynne. Blokowanie szkodliwych efektów reakcji komórek układu immunologicznego i promowanie korzystnych oddziaływań w procesach reparacji, zniszczonych w wyniku udaru struktur, wydaje się celowe w przyszłych strategiach terapeutycznych. W ostatnich latach dużym zainteresowaniem cieszą się mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs). Z badań eksperymentalnych wynika, że nawet przejściowa krótkotrwała obecność MSCs w tkance gospodarza po ich przeszczepieniu powoduje pozytywny efekt w postaci stymulacji procesów naprawczych po urazie i modulacji odpowiedzi immunologicznej biorcy. Wykazano, iż MSCs mają zdolność zarówno supresji jak i aktywacji odpowiedzi immunologicznej, co w świetle najnowszych wyników badań dotyczących schorzeń OUN ogranicza uszkodzenie tkanki i sprzyja regeneracji. To stałe współdziałanie (*cross-talk*) pomiędzy MSCs dawcy i komórkami immunologicznie czynnymi gospodarza wydaje się niezwykle istotne dla prawidłowej homeostazy w OUN oraz przeżycia i zachowania funkcji pozostałych po uszkodzeniu neuronów. Stąd rozwój „immunomodulatorowych strategii”, które będą kontrolowały funkcje poszczególnych populacji komórek immunologicznych w różnych fazach udaru, wydaje się obiecującym kierunkiem w terapii. Transfer mezenchymalnych komórek macierzystych (MSCs), które wykazują silne właściwości immunomodulacyjne, może być jednym z nich.

Z uwagi na silne właściwości parakryne, przeszczepione MSCs uwalniają w środowisku gospodarza szereg czynników troficznych, m.in. rozpuszczalne glikoproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej, czynniki wzrostu, cytokiny, które uczestniczą w ograniczaniu procesów zapalnych, apoptozy i fibrozy uszkodzonych tkanek. Badania przeprowadzone w ostatnich latach wykazały, że czynniki MSCs przekazywane są nie tylko w postaci uwolnionej, ale także za pośrednictwem zewnątrzkomórkowych pęcherzyków (EVs). Wydaje się, że EVs uwalniane z MSCs mogą spełniać takie same funkcje jak komórki, z których pochodzą. Z dotychczasowych badań wiadomo, że EVs zawierają receptory błonowe oraz białka, lipidy, kwasy nukleinowe i różne formy mRNA, które przekazywane do otaczających komórek mogą zmieniać ich los i właściwości. W przypadku transplantacji w warunkach ischemii, będąc naturalnymi nośnikami substancji bioaktywnych, EVs mogą re-programować endogenne komórki w uszkodzonej tkance, modulując ich funkcje oraz działać immunosupresyjnie, ograniczając odpowiedź prozapalną. Weryfikacja efektów działania EVs w badaniach przedklinicznych w porównaniu z przeszczepem MSCs jest konieczna, dlatego postanowiliśmy, że temat ten będzie przedmiotem moich badań realizowanych w ramach pracy doktorskiej.

Celem badań była ocena właściwości immunomodulacyjnych ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego oraz wyizolowanych z nich zewnątrzkomórkowych pęcherzyków przeszczepianych u dorosłych szczurów w modelu cytotoksycznego uszkodzenia mózgu ouabainą.

Przedmiotem badań były ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego (hBM-MSCs) komercyjnie dostępne firmy Lonza i izolowane z nich zewnątrzkomórkowe pęcherzyki (EVs), oceniane w eksperymentach *in vitro* i *in vivo* po ich transplantacji u szczurów. Wybrany do badań model cytotoksycznego uszkodzenia mózgu z zastosowaniem inhibitora pompy sodowo-potasowej (ouabainy) został opracowany w naszym zespole. Szczegółowo opisane wcześniej ogniskowe uszkodzenie tkanki dotyczyło w różnym stopniu poszczególnych struktur prądkowia.

Cel mojej pracy doktorskiej był realizowany w oparciu o badania dotyczące:

- opracowania metody izolacji EVs z hBM-MSCs, ich charakterystyki i wyboru techniki optymalnego znakowania w celu wizualizacji EVs w badaniach *in vitro* i *in vivo*
- określenia migracji hBM-MSCs i EVs podanych dotętniczo oraz możliwości zasiedlania przez nie rejonów mózgu biorców przeszczepu w modelu cytotoksycznego uszkodzenia mózgu
- oceny wrodzonej i adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej w mózgu szczura, poddanego wcześniej uszkodzeniu prądkowia, po przeszczepie hBM-MSCs i EVs

3. Materiał

3.1. Ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego

Przedmiotem badań były ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste wyizolowane ze szpiku kostnego (hBM-MSCs) zdrowych dorosłych dawców obu płci, dostępne komercyjnie (Lonza). Zamrożone hBM-MSCs dostarczane do naszego laboratorium w liczbie 75×10^4 komórek, stanowiących pasaż drugi, były hodowane *in vitro* w celu ich namnażania aż do uzyskania określonych ilości potrzebnych do badań eksperymentalnych.

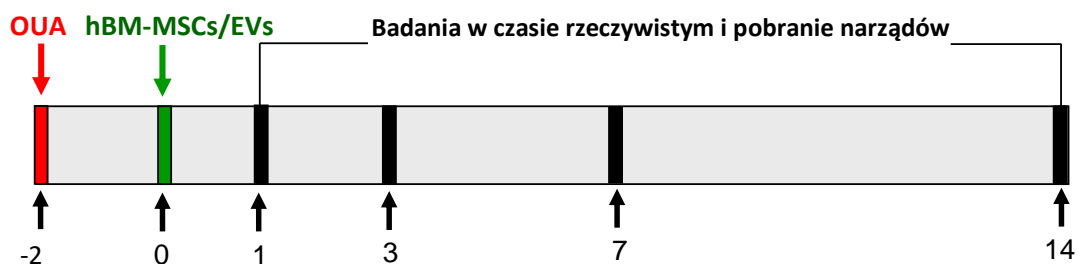
3.2. Zwierzęta doświadczalne

Do badań *in vivo* wykorzystano dorosłe samce szczurów stada Wistar, w wieku około 3 miesięcy, o ciężarze ciała 250-280 g, pochodzące z Charles River Sulzfeld, hodowane w Zwierzętarni Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN. Podczas trwania eksperymentów szczury przebywały w klatkach hodowlanych w pomieszczeniu pooperacyjnym w warunkach fotoperiodu 12:12 godzin, mając stały dostęp do wody i pożywienia. Wszystkie procedury eksperymentalne były prowadzone zgodnie z wytycznymi Unii Europejskiej, za zgodą I Lokalnej Komisji Etycznej w Warszawie (uchwały: 52/2013 z dnia 14.11.2013 i 164/2016 z dnia 16.11.2016).

3.3. Grupy doświadczalne

Podczas doświadczeń zwierzęta laboratoryjne zostały podzielone na poszczególne grupy eksperymentalne, z których każda liczyła 6 szczurów:

- Grupa I – grupa kontrolna- zwierzęta zdrowe, nie poddane żadnym zabiegom
- Grupa II – zwierzęta poddane uszkodzeniu mózgu ouabainą
- Grupa III - zwierzęta poddane uszkodzeniu mózgu ouabainą i transplantacji ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego
- Grupa IV - zwierzęta poddane uszkodzeniu mózgu ouabainą i transplantacji zewnątrzkomórkowych pęcherzyków wyizolowanych z ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego.



Ryc. 6. Schemat doświadczeń (OUA – wykonanie uszkodzenia mózgu ouabainą, hBM-MSCs/EVs przeszczep komórek lub pochodzących z nich zewnątrzkomórkowych pęcherzyków).

4. Metody badań

4.1. Hodowla komórek hBM-MSCs

Ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego (hBM-MSCs) (Lonza) były wysiewane do butelek o powierzchni 75 cm² w gęstości 3x10⁵ komórek/butelkę i hodowane w pożywce MSCBMTM (Lonza) z dodatkiem 10% MCGS, L-glutaminy i gentamycyny, w atmosferze powietrza z zawartością, 5% CO₂, o wilgotności 95% i temp. 37°C. Pożywka hodowlana była wymieniana na świeżą, co 2-3 dni. W celu utrzymania stałego poziomu proliferacji hBM-MSCs były pasażowane w odstępach 5-dniowych po osiągnięciu przez nie 70-80% konfluentnego wzrostu. Do doświadczeń używano komórek pochodzących z pasaży 4 – 6.

4.2. Znakowanie komórek hBM-MSCs za pomocą Molday ION

hBM-MSCs przeznaczone do badań były znakowane Molday ION (BioPAL) zawierającym nanocząstki żelaza skoniugowane z rodaminą B. W tym celu do hodowli hBM-MSCs, które osiągnęły 70-80% konfluentnego wzrostu, dodawano do podłoża 20 µg/ml Molday ION i inkubowano komórki ze znacznikiem przez 18 godzin w atmosferze powietrza z zawartością, 5% CO₂, o wilgotności 95% i temp. 37°C. Po tym czasie wyznakowane hBM-MSCs trzykrotnie płukano w buforowanej soli fizjologicznej (PBS) i umieszczano w świeżej pożywce MSCBMTM (Lonza). Tak przygotowane komórki używano do dalszych eksperymentów.

4.3. Znakowanie komórek hBM-MSCs za pomocą PKH26

Znakowanie hBM-MSCs za pomocą lipofilnego barwnika PKH26 (Sigma) przeprowadzano zgodnie z instrukcją producenta. W tym celu zebrane z hodowli komórki zawieszano w PBS i 100 µl zawiesiny hBM-MSCs, dodawano do 1 ml rozpuszczalnika (Diluent C), jednocześnie do kolejnej porcji 1 ml rozpuszczalnika dodawano 4 µl PKH26, mieszając natychmiast te dwa roztwory. Podczas znakowania hBM-MSCs inkubowano z PKH26 przez 5 minut w ciemności w temperaturze pokojowej, po tym czasie reakcja była blokowana przy użyciu 2 ml 10% bydlęcej surowicy płodowej (FBS). Następnie do mieszaniny reakcyjnej dodawano PBS i wirowano przy prędkości 400 x g przez 10 minut w temperaturze pokojowej, supernatant usuwano, a do osadu komórek dodawano podłoże hodowlane MSCBMTM i wirowano trzykrotnie przy prędkości 400 x g przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Wyznakowane komórki były używane do przeprowadzenia dalszych eksperymentów.

4.4. Izolacja zewnątrzkomórkowych pęcherzyków (EVs) uwalnianych z hBM-MSCs podczas hodowli komórek *in vitro*

Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki uwalniane przez hBM-MSCs natywne lub wcześniej znakowane Molday ION czy PKH26 podczas hodowli komórek *in vitro* były izolowane z ich nadsączu hodowlanych. W tym celu w prowadzonych hodowlach hBM-MSCs wykazujących 50% konfluencji wymieniano pożywkę MSCBMTM (Lonza) na świeżą i prowadzono dalszą hodowlę komórek przez 2-3 dni w atmosferze powietrza z zawartością, 5% CO₂, o wilgotności 95% i temp. 37°C. EVs były izolowane z pożywki pochodzącej z hodowli 5x10⁵ hBM-MSCs, wykazujących 90% konfluentnego wzrostu. W tym celu nadsącz z takich hodowli zbierano i wirowano dwukrotnie, początkowo przy prędkości 200 x g, przez 10 minut, a następnie przy prędkości 500 x g, przez 10 minut, w temp. 4°C w celu usunięcia obumarłych komórek i zamrażano w temp. -70°C. Przed wykonaniem eksperymentów nadsącz z zawartymi EVs rozmrażano, wirowano przy prędkości 2000 x g, przez 20 minut w temp 4°C w celu usunięcia martwych komórek i pęcherzyków apoptotycznych, a następnie

poddawano go dwukrotnemu ultrawiroванию przy prędkości 100 000 x g w temp. 4°C przez 75 minut w celu otrzymania mikropęcherzyków. Wyizolowane EVs były zawieszane w 100 µl dejonizowanego PBS (DPBS, Lonza) i wykorzystywane do badań lub zamrażane w temp. -70°C do dalszych eksperymentów.

4.5. Analiza zewnątrzkomórkowych pęcherzyków wyizolowanych z mezenchymalnych komórek macierzystych za pomocą aparatury NanoSight

Wielkość i koncentracja zewnątrzkomórkowych pęcherzyków była analizowana przy użyciu aparatury NanoSight NS300 (Malvern, UK), z wykorzystaniem kamery cCMOS i niebieskiego lasera 488 nm. W tym celu EVs były zawieszane w 1 ml DPBS i analizowane za pomocą NanoSight z oprogramowaniem w wersji 3.2. Pomiaru dokonano w sześciu próbkach pochodzących z sześciu odrębnych izolacji, każda próbka mierzona była 3 razy przez 60 sekund w stałej temp. 23°C. Dla każdego pomiaru sporządzono histogramy, które były następnie uśredniane, wyniki przedstawione zostały, jako wartość średnia z sześciu mierzonych próbek.

4.6. Znakowanie EVs za pomocą PKH26

Wyizolowane z natywnych hBM-MSCs EVs były znakowane przy użyciu lipofilnego znacznika PKH26. W tym celu 100 µl zawiesiny EVs dodawano do 1 ml rozpuszczalnika (Diluent C). Jednocześnie do kolejnej porcji 1 ml rozpuszczalnika dodawano 4 µl PKH26, mieszając natychmiast te dwa roztwory. Podczas znakowania EVs inkubowano z PKH26 przez 5 minut w ciemności w temperaturze pokojowej, po tym czasie reakcja była blokowana przy użyciu 2 ml 10% FBS, a następnie do mieszaniny reakcyjnej dodawano dejonizowany PBS i wyznakowane EVs były izolowane poprzez ultrawiroвание przy prędkości 100 000 x g w temp. 4°C przez 75 minut, zawieszane w 100µl DPBS (Lonza) i wykorzystywane do badań lub zamrażane w temperaturze -70°C do czasu ich użycia w kolejnych doświadczeniach.

4.7. Analiza hBM-MSCs i EVs in vitro w transmisyjnym mikroskopie elektronowym

W celu wizualizacji pęcherzyków endosomalnych obecnych w hBM-MSCs lub zewnątrzkomórkowych pęcherzyków wyizolowanych z tych komórek została przeprowadzona analiza w transmisyjnym mikroskopie elektronowym. W tym celu hBM-MSCs oraz EVs były utrwalane w 2% roztworze paraformaldehydu (Sigma Aldrich, Germany) i 2.5% roztworze glutaraldehydu (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) w 0,1M buforze kakodylowym, pH 7,4 w 4°C przez 16 godzin i płukane w 0.1 M roztworze kakodylowym o pH 7.4. Proces utrwalania hBM-MSCs lub EVs przeprowadzano w 1% czterotlenku osmu (Sigma, USA), EVs odwadniano w szeregu alkoholi i tlenku propylenu (abcr GmbH, Germany), zatapiano w bloczkach żywicy Agar 100 R1030 (Agar, USA), po czym krojono na skrawki o grubości 50 nm przy użyciu ultramikrotomu RCM. Skrawki z zatopionymi hBM-MSCs lub EVs barwiono przy użyciu octanu urylnal i cytrynianu ołowiu. Zdjęcia hBM-MSCs i EVs wykonano w mikroskopie elektronowym JEM 1200EX w Środowiskowym Laboratorium Mikroskopii Elektronowej IMDiK PAN.

4.8. Analiza EVs w rezonansie magnetycznym

Analiza MRI została przeprowadzona z wykorzystaniem rezonansu magnetycznego firmy Bruker, model Biospec 70/30USR o indukcji pola magnetycznego 7T w Środowiskowym Laboratorium Rezonansu Magnetycznego Małych Zwierząt IMDiK PAN. Do analizy wykorzystano hBM-MSC-EVs wyznakowane za pomocą Molday ION oraz niewyznakowane, stanowiące kontrole.

EVs rozpuszczane były w 200 µl DPBS w probówkach typu eppendorf i umieszczane w fantomie zawierającym agar w celu stabilizacji próbek i usunięcia artefaktów pochodzących z otoczenia. Analizy dokonano za pomocą obrazowania T2-zależnego przy parametrach: TR=2500 ms, TE=36 ms, FA=180 deg, TA=2 min 40 s. Dane były obliczane na podstawie zmian w czasie relaksacji dla poszczególnych próbek.

4.9. Analiza EVs za pomocą wysokorozdzielczej cytometrii przepływowej

Obecność znaczników i antygenów powierzchniowych obecnych na EVs była oceniana za pomocą wysokorozdzielczego cytometru przepływowego (Apogee Flow Systems, Hemel Hempstead, UK) w Ośrodku Badań Genetycznych i Nutrogeomiki Małopolskiego Centrum Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. W tym celu EVs były inkubowane z wybranymi przeciwciałami: skoniugowanymi z izotiocyjaninem fluoresceiny (FITC) anty-CD9 klon M-L13, anty-CD63 klon H5C6, anty-CD81 klon JS-81 (wszystkie z BD Bioscience, San Jose, USA), skoniugowanymi z fikoerytryną (PE) anty-CD44 klon BJ18, anty-CD73 klon AD2 i anty-CD90 klon 5E10 (wszystkie z BioLegend, San Diego, USA), oraz z odpowiednimi kontrolami izotypowymi. Przed użyciem wszystkie przeciwciała były wirowanie z prędkością 21 000 g przez 20 minut w 4°C w celu usunięcia agregatów białkowych. EVs były rozpuszczane w DPBS i inkubowane z odpowiednimi przeciwciałami przez 20 minut w temperaturze 4°C. Dodatkowo, zewnątrzkomórkowe pęcherzyki były znakowane za pomocą lipofilnego markera PKH26 według procedury, próbki niezawierające pęcherzyków, lecz sam marker PKH26 lub FBS zostały wykorzystane, jako kontrole. Wyznakowane EVs były zawieszane w DPBS i analizowane w cytometrze przepływowym dedykowanym małym cząstkom Apogee A50-Micro flow cytometer. Udział procentowy pozytywnych zdarzeń był obliczany przy użyciu oprogramowania Apogee Histogram (Apogee Flow Systems).

4.10. Analiza EVs i hBM-MSCs przy pomocy metody Western Blot

Poprawność izolacji oraz czystość wyizolowanych EVs została zweryfikowana poprzez analizę zawiesiny mikropęcherzyków, przy udziale specyficznych przeciwciał, metodą Western Blot. Kontrolę stanowiły hBM-MSCs, które poddano homogenizacji w buforze do lizy CelLytic™ MT (Sigma-Aldrich) z dodatkiem mieszaniny inhibitorów proteaz (Sigma-Aldrich), a następnie wirowano przez 10 minut w 4°C przy prędkości 11500 rpm. W zebranych nadsączach z komórek po ich homogenizacji i w otrzymanych po izolacji zawiesinach EVs mierzono ilość białka za pomocą zmodyfikowanej reakcji Lowry'ego przy użyciu zestawu DC Protein Assay (Bio-Rad). Próbki EVs i hBM-MSCs były rozdzielane za pomocą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu dodecylu sodu (SDS-PAGE) i przenoszone na membrany nitrocelulozowe (Amersham, Sigma-Aldrich). Po reakcji blokowania przy użyciu 5% roztworu odtłuszczonego mleka w TRIS-buforowanej soli fizjologicznej (TBST), przeprowadzanej w temperaturze pokojowej przez 60 min, na membrany nakładano specyficzne przeciwciała I-rzędowe przeciwko ludzkim antygenom: β-aktynie (1:2000; ThermoFisher Scientific) i kalneksynie (1:500; ThermoFisher Scientific), a po inkubacji prowadzonej w temperaturze 4°C przez 12 godzin, membrany płukano i przeprowadzano dalszą reakcję z zastosowaniem przeciwciał II-rzędowych skoniugowanych z peroksydazą chrzanową: odpowiednio z kozim anty-mysim IgG, IgM (H+L) (1:4000; ThermoFisher Scientific) i króliczym anty-kozim IgG (H+L) (1:4000; ThermoFisher Scientific), w temperaturze pokojowej przez 60 min. Sygnały reakcji były wizualizowane przy pomocy zestawu chemiluminescencyjnego ECL (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA).

4.11. Współhodowle EVs i hBM-MSCs

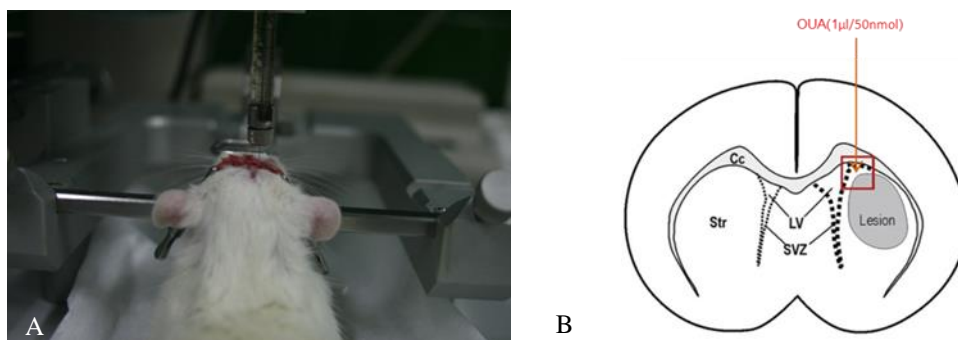
W celu zbadania zdolności migracji wyizolowanych ze znakowanych komórek EVs do wnętrza komórek współhodowano je z hBM-MSCs pochodzącymi z pasażu 5 lub 6. W tym celu hBM-MSCs były wysiewane na szkiełka pokryte polilizyną umieszczone w 24-dołkowej płytce w gęstości 10^3 komórek/cm³ i hodowane w temp. 37°C, w 5% CO₂ przez 24 godziny. Kolejnym etapem było dodanie do hodowli komórek EVs wyznakowanych PKH26 lub SPIO i ich współhodowla przez 24 godziny. Po tym czasie szkiełka odpłukiwano, a obecne wewnątrz komórek EVs analizowano barwieniami immunocytochemicznymi i oceniano przy użyciu mikroskopu konfokalnego (Zeiss LSM 780).

4.12. Analiza immunocytochemiczna

Badania immunocytochemiczne miały na celu określenie natywnych jak i egzogennych EVs wewnątrz hBM-MSCs po ich współhodowli w warunkach *in vitro*. W tym celu komórki po 24 godz. inkubacji z EVs utrwalano w 4% paraformaldehydzie (PFA) przez 15 minut w temp. pokojowej, a następnie blokowano niespecyficzne epitopy poprzez dodanie 10% surowicy koziej (60 minut w temp. pokojowej). Reakcje immunocytochemiczne przeprowadzano stosując I-rzędowe specyficzne dla określonych antygenów typowych dla ludzkich komórek mezenchymalnych: CD44 (1:100); CD73 (1:100); CD90 (1:100); STEM121 (1:100) oraz tetraspanin: CD63 (1:100); CD81 (1:100); CD9 (1:100) (Tabela 1). Po 24 godzinnej inkubacji w temp. 4°C, po odpłukaniu przeciwciał I-rzędowych dodawano przeciwciała II-rzędowe skoniugowane z fluorochromem Alexa Fluor 488: kozie antymysie w odpowiednim izotypie: IgG1, IgG3 lub IgG2b (1:1000) w celu rozwinięcia reakcji barwnych. Procedurę barwienia komórek przeprowadzano przez 60 min inkubacji hBM-MSCs z przeciwciałami II-rzędowymi w ciemności w temperaturze pokojowej. Dodatkowo jądra badanych komórek barwiono przy użyciu 5 µM Hoechst 33258 (Life Technologies). Jako kontrolę specyficzności użytych przeciwciał zastosowano powyższą procedurę barwienia z pominięciem I-rzędowych przeciwciał. Po końcowym płukaniu preparaty były zamykane przy użyciu Fluorescence Mounting Medium (Dako). Wyniki uzyskane w badaniach analizowano w mikroskopie konfokalnym (Zeiss LSM 780) oraz z wykorzystaniem głowicy Elyra i systemu superrozdzielczości (SR-SIM) w Środowiskowym Laboratorium Laserowych Techniki Mikroskopowych IMDiK PAN.

4.13. Model uszkodzenia prążkowania szczura ouabainą

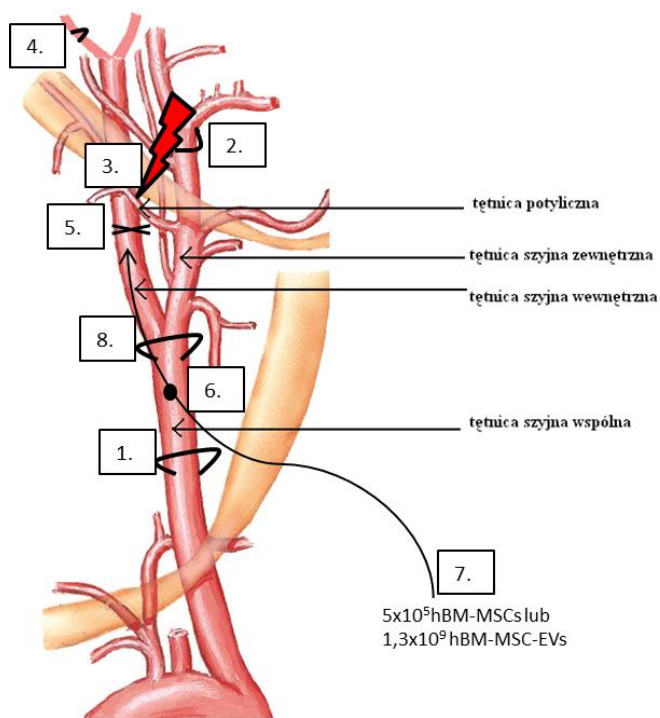
Do badań został wykorzystany opracowany w naszym zespole model cytotoksycznego uszkodzenia mózgu polegający na stereotaktycznym podaniu inhibitora pompy Na⁺/K⁺ (ouabainy) do prążkowania szczura (Janowski 2004). Podczas zabiegu operacyjnego dorosłe samce szczurów stada Wistar były poddane znieczuleniu ogólnemu poprzez dootrzewnowe podanie ketaminy (53mg/kg) oraz medetomidyny (0.4g/kg). Zwierzęta będące w narkozie umieszczano w aparacie stereotaktycznym (Stoelting), wykonywano u nich nacięcie skóry głowy wzdłuż szwu strzałkowego i nawiercano otwór trepanacyjny o średnicy 0,5 cm na sklepiści czaszki, nad prawą półkulą. Przy użyciu 5 µl strzykawki Hamiltona zakończonej igłą o długości 15 mm i średnicy 33 mm, z zastosowaniem pompy infuzyjnej podawano 1µl 50nmol roztworu ouabainy (OUA) z prędkością 0,5 µl/min do prążkowania prawej półkuli szczura (koordynaty: A 0.5, L 3.8, D 4.7 mm; punktami odniesienia w płaszczyźnie horyzontalnej była bregma). Po podaniu ouabainy igła iniekcyjna pozostawała w mózgu szczura przez kolejnych 5 minut, aby zapobiec wstecznemu wpływowi podanego roztworu. Po wyjęciu igły brzegi rany na skórze zostały zespolone nicią chirurgiczną. Po operacji zwierzętom podawano podskórnie antybiotyk (Baytril, 0,4g/kg ciężaru ciała szczura) i środek przeciwbólowy (Rycarfa, 5mg/kg ciężaru ciała szczura).



Ryc. 7. Zdjęcie przedstawia zabieg stereotaktycznego podania ouabainy do prążkowania prawej półkuli mózgu szczura (A), obok schemat struktur mózgu szczura z zaznaczeniem miejsca podania ouabainy (B).

4.14. Transplantacja komórek hBM-MSCs lub EVs

Dorośle szczury stada Wistar, u których 48 godz. wcześniej wykonano uszkodzenia mózgu ouabainą były biorcami hBM-MSCs lub EVs, podawanymi dotętniczo. W celu dokonania zabiegu transplantacji zwierzęta były poddawane narkozie poprzez dootrzewnowe podanie ketaminy (53 mg/kg) oraz medetomidyny (0.4 g/kg). Komórki lub zewnątrzkomórkowe pęcherzyki podawano do prawej tętnicy szyjnej wewnętrznej biorcy. W początkowym etapie izolowano i podwiązywano prawą tętnicę szyjną wspólną, prawą tętnicę szyjną zewnętrzną i skrzydłowo-podniebienną. Dodatkowo koagulowano tętnicę potyliczną i zakładano zacisk na prawą tętnicę szyjną wewnętrzną. Następnie nacinano prawą tętnicę szyjną wspólną, do której wprowadzano cewnik, tak, aby jego końcówka dochodziła do prawej tętnicy szyjnej wewnętrznej, następnie usuwano zacisk. Komórki hBM-MSCs (5×10^5) lub EVs ($1,3 \times 10^9$ wyizolowane z 5×10^6) w objętości 1 ml soli fizjologicznej, wcześniej wyznakowane Molday ION lub PKH26, podawano bezpośrednio do prawej tętnicy szyjnej wewnętrznej z prędkością 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ przy użyciu pompy GenieTouch Syringe Pump. Po zabiegu transplantacji zakładany był ponownie zacisk na prawą tętnicę szyjną wewnętrzną, usuwano cewnik i zszywano tętnicę szyjną wspólną, po czym zdejmowano zacisk. Rana operacyjna była zamykana przy użyciu szwów chirurgicznych. Po operacji szczurom podawano podskórnie antybiotyk (Baytril, 0,4 g/kg ciężaru ciała szczura) i środek przeciwbólowy (Rycarfa, 5 mg/kg ciężaru ciała szczura).



1. Izolacja i podwiązanie prawej tętnicy szyjnej wspólnej;
2. Podwiązanie prawej tętnicy szyjnej zewnętrznej;
3. Koagulacja prawej tętnicy potylicznej;
4. Podwiązanie prawej tętnicy skrzydłowo-podniebiennej;
5. Założenie zacisku na prawą tętnicę szyjną wewnętrzną;
6. Nacięcie prawej tętnicy szyjnej powyżej szwu i włożenie cewnika;
7. Usunięcie zacisku i podanie 5×10^5 hBM-MSCs lub $1,3 \times 10^9$ hBM-MSC-EVs;
8. Podwiązanie tętnicy szyjnej wspólnej, zdjęcie zacisku, zszycie rany operacyjnej.

Ryc. 8. Schemat operacji mikrochirurgicznej mającej na celu zaopatrzenie naczyń krwionośnych przed dotętniczym przeszczepem hBM-MSCs lub EVs

4.15. Analiza przeszczepionych hBM-MSCs w MRI w czasie rzeczywistym

Przyżyciowe badania szczurów w celu analizy podanych dotętniczo komórek hBM-MSCs znakowanych Molday ION w mózgu biorców przeprowadzono w rezonansie magnetycznym firmy Bruker, model Biospec 70/30USR o indukcji pola magnetycznego 7T. Przed wykonaniem badania szczury były poddawane narkozie wziewnej przy użyciu izofluranu i umieszczane w rezonansie magnetycznym. Mózgi zwierząt skanowano w MRI przed podaniem komórek, podczas transplantacji hBM-MSCs i bezpośrednio po ich przeszczepieniu oraz w sekwencjach czasowych 1, 3 i 7 dni po podaniu hBM-MSCs, przy użyciu sekwencji T2 i T2*.

4.16. Pobieranie materiału do badań

W celu pobrania materiału do badań po zakończeniu eksperymentów (1,3,7 i 14 dni od zabiegu transplantacji hBM-MSCs lub EVs) szczury były poddawane głębokiej narkozie poprzez dootrzewnowe wstrzyknięcie ketaminy (53 mg/kg) oraz medetomidyny (0,4 g/kg) i dekapitowane. Przedmiotem badań były mózgi i węzły chłonne szyjne szczurów, izolowane na lodzie, zamrażane w suchym lodzie i przechowywane w temp. -70°C . Przed wykonaniem skrawków narządy przenoszono do kriostatu, ogrzewano do temp. -20°C i krojono w płaszczyźnie czołowej na skrawki o grubości $25 \mu\text{m}$, które umieszczano na szkiełkach podstawowych. Po wysuszeniu skrawki narządów analizowano metodami immunohistochemicznymi.

4.17. Analiza immunohistochemiczna

Analiza immunohistochemiczna przeszczepianych hBM-MSCs i EVs była przeprowadzana w mózgu, węzłach chłonnych szyjnych i śledzionie szczurów w poszczególnych sekwencjach czasowych. Dodatkowo oceniano populacje komórek immunologicznie czynnych w mózgu zwierząt

eksperymentalnych. W tym celu skrawki narządów utrwalano w 4% paraformaldehydzie przez 15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie blokowano i permabilizowano poprzez dodanie mieszaniny 10% surowicy koziej (GS), 0,25% Tritonu i 0,1% albuminy surowicy bydlęcej (BSA) (60 min, temp. pokojowa). Następnie dodawano przeciwciała I-rzędowe specyficzne dla ludzkich antygenów: mysie anti-ludzkie: CD44 (1:100), STEM121 (1:100) oraz rozpoznające antygeny szczura: mysie anti-szczurze: CD15 (1:20), CD4 (1:300), CD45 (1:100), CD5 (1:80), CD8 (1:300), ED1 (1:100) i królicze anti-szczurze: GFAP (1:200), inkubując preparaty 24 godz. w temp. 4°C. Po odpłukaniu przeciwciał I-rzędowych dodawano przeciwciała II-rzędowe skoniugowanych z fluorochromem Alexa 488: kozie anti-mysie lub kozie anti-królicze w odpowiednim izotypie: IgG1, IgM lub IgG(H+L) (1:500). Po odpłukaniu przeciwciał II-rzędowych jądra komórkowe barwione były przy użyciu 5 µM Hoechst 33258 (Life Technologies). Dodatkowo do skrawków mózgow szczura dodawano roztwór czerni Sudanowej w celu wyciszenia autofluorescencji tkanki. Po końcowym płukaniu preparaty były zamykane przy użyciu Fluorescence Mounting Medium (Dako). Wyniki uzyskane w badaniach analizowano za pomocą mikroskopu konfokalnego (Zeiss LSM 780).

4.18. Homogenizacja mózgow szczurzych i pomiar ilości białka

W celu oznaczenia cytokin i chemokin w mózgow szczurów przeprowadzano homogenizację metodą mechanicznego rozcierania tkanki w homogenizatorze w 1ml buforu zawierającym: 20 mM Tris-HCl (pH=7,5), 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 0,05 Tween-20 oraz mieszaninę inhibitorów proteaz (Sigma). Otrzymane homogenaty mózgu wirowano przez 10 minut w temp. 4°C przy prędkości obrotów 11500 rpm w celu usunięcia *debris* komórek. W zebranych nadsączach określano ilość białka za pomocą zmodyfikowanej reakcji Lowry'ego przy użyciu zestawu DC Protein Assay (Bio-Rad). Wartości absorbancji dla poszczególnych próbek wprost proporcjonalne do ilości białka zawartego w homogenatach zostały zmierzone po 20 minutach przy długości fal 450 nm na spektrofotometrze (Omega) i przeliczone względem krzywej standardowej dla BSA. Homogenaty mózgow szczura odpowiednio rozcieńczono za pomocą buforu do homogenizacji i zamrożono w -70°C do dalszych badań, które miały na celu określenie poziomu wybranych cytokin i chemokin.

4.19. Analiza poziomu cytokin i chemokin w homogenatach mózgu szczurów za pomocą aparatu Luminex

Analiza poziomu wybranych cytokin oraz chemokin pro- i przeciwzapalnych była przeprowadzona w homogenatach pochodzących z mózgow szczurzych, z wykorzystaniem zestawów specyficznych dla białek szczura BioPlexPro w technologii Luminex (BioRad). Przed przystąpieniem do badania część próbek przeznaczona do oznaczenia poziomu TGF-β była aktywowana poprzez inkubację z 1 N HCl przez 10 minut w temperaturze pokojowej, następnie reakcja była blokowana przez dodanie 1.2 N NaOH z 0.5 M HEPES. W celu przeprowadzenia analizy, badane próbki nadsączy mózgu szczura rozcieńczono w stosunku 1:1 w buforze (Diluent Buffer) z dodatkiem 0.5% BSA, a liofilizat standardów rozcieńczono w 500 µl tego samego buforu i inkubowano 30 minut na lodzie. W płytkach 96-dołkowych umieszczono kulki magnetyczne opłaszczone cytokinami: IL-1α, IL-1β, IL-4, IL-6, IL-10, IFN-γ, TNFα, TGFβ-1, TGFβ-2, TGFβ-3 oraz chemokinami: CXCL1, MIP-1α, MIP-3α, MCP-1. Po dwukrotnym przepłukaniu płytki buforem (Rinse Buffer), zalecanym przez producenta, nałożono odpowiednio przygotowane standardy lub nadsączy z homogenatów mózgow szczurzych, każdy w trzech powtórzeniach. Tak przygotowaną płytkę inkubowano w temp. pokojowej przez 60 lub 120 minut, stale mieszając z prędkością 850 rpm/min. Po tym czasie zawartość płytki przepłukano trzykrotnie, dodano specyficzne przeciwciała detekcyjne i płytkę inkubowano w temp. pokojowej przez kolejne 30 lub 60 minut, mieszając z prędkością 850 rpm/min. Następnie płytkę

trzykrotnie przepłukano, dodano przeciwciało skoniugowane ze streptawidyną i inkubowano w temp. pokojowej przez 15 lub 30 minut mieszając płytkę z prędkością 850 rpm/min. Po przepłukaniu płytki dodawano bufor (Assay Buffer) i dokonano odczytu za pomocą aparatury Luminex (BioRad).

4.20. Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki liczbowe przedstawiono jako wartości średnie z poszczególnych doświadczeń \pm SD. W celu oceny statystycznej istotności różnic pomiędzy wartościami średnimi została przeprowadzona jednoczynnikowa analiza wariancji ANOVA oraz test Tukeya. Do wszystkich obliczeń został zastosowany program Prism 3.0. Poziom istotności mniejszy niż 0.05 przyjęto za statystycznie znamienne.

Tabela 1. Wykaz przeciwciał pierwszorzędowych wykorzystanych w badaniach immunocytochemicznych i immunohistochemicznych

Przeciwciało	Izotyp, rozcieńczenie	Producent, Nr katalogowy
mysie monoklonalne anti-CD15	IgM, 1:20	Serotec, MCA967
mysie monoklonalne anti-CD44	IgG1, 100	Santa Cruz, sc-7297
mysie monoklonalne anti-CD45RA	IgG1, 1:100	Serotec, MCA340R
mysie monoklonalne anti-CD5	IgG1, 1:80	Serotec, MCA52R
mysie monoklonalne anti-CD63	IgG1, 1:100	BD Pharmingen, 556019
mysie monoklonalne anti-CD73	IgG3, 1:100	Santa Cruz, sc-32299
mysie monoklonalne anti-CD81	IgG2b, 1:100	Santa Cruz, sc-166028
mysie monoklonalne anti-CD9	IgG1, 1:100	BD Pharmingen, 555370
mysie monoklonalne anti-CD90	IgG1, 1:100	Santa Cruz, sc-59398
mysie monoklonalne anti-ED1	IgG1, 1:100	Serotec, MCA341R
królicze poliklonalne anti-GFAP	IgG(H+L), 1:200	Dako, Z 0334
mysie monoklonalne anti-STEM121	IgG1, 1:100	Cellartis, Y40410

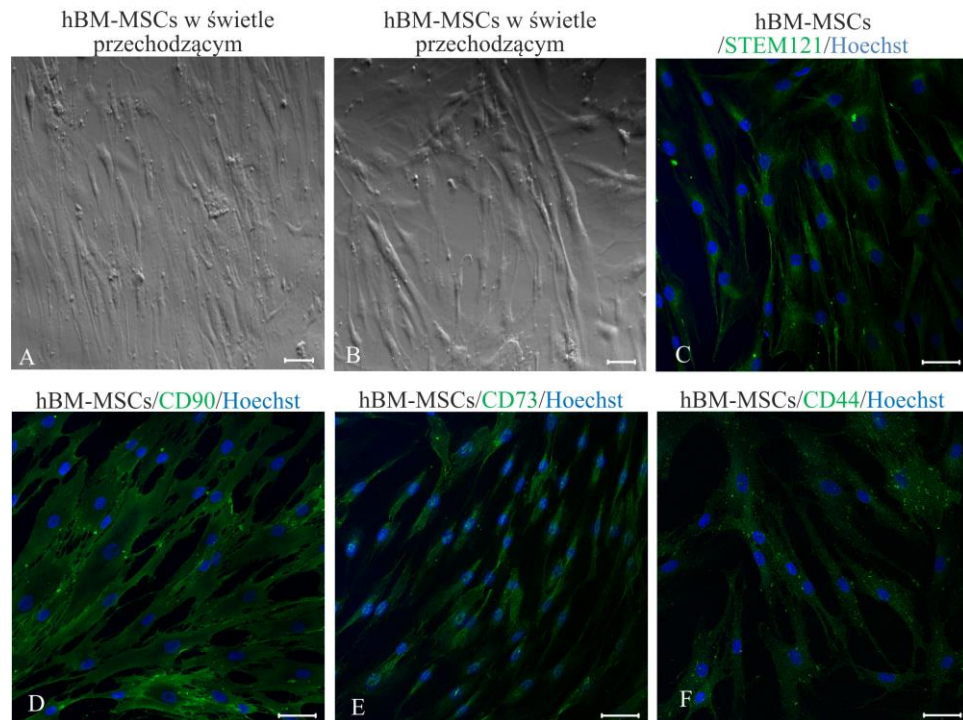
Tabela 2. Wykaz przeciwciał drugorzędowych wykorzystanych w badaniach immunocytochemicznych i immunohistochemicznych

Przeciwciało	Fluorofor	Izotyp, rozcieńczenie	Producent, Nr kat.
kozy anti-mysie Alexa Fluor	Alexa 488	IgG1, 1:500/1:1000	Invitrogen, A21121
kozy anti-mysie Alexa Fluor	Alexa 488	IgG2b, 1:500/1:1000	Invitrogen, A21141
kozy anti-mysie Alexa Fluor	Alexa 488	IgG3, 1:500/1:1000	Invitrogen, A21151
kozy anti-mysie Alexa Fluor	Alexa 488	IgM, 1:500/1:1000	Invitrogen, A21042
kozy anti-królicze Alexa Fluor	Alexa 488	IgG(H+L), 1:500/1:1000	Invitrogen, A11008

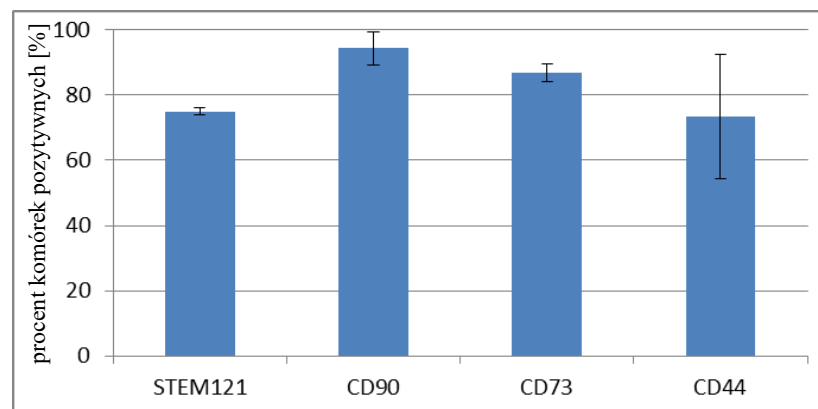
5. Wyniki

5.1. Ocena morfologiczna i fenotypowa komórek hBM-MSCs *in vitro*

Ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego w hodowli *in vitro* tworzą homogeną populację komórek adherentnych o wrzecionowatym kształcie (ryc. 9A-B). hBM-MSCs wykazują wysokie tempo proliferacji, po 5 dniach hodowli osiągają 90% konfluencji wzrostu. Analiza specyficznych markerów ujawniła obecność STEM121 ($75.0\pm 1.4\%$), a także antygenów typowych dla komórek mezenchymalnych: CD90 ($94.3\pm 5.1\%$), CD73 ($86.8\pm 2.7\%$) i CD44 ($73.5\pm 19\%$) (ryc.9C-F,) (ryc.10). Taki profil ekspresji markerów przez hBM-MSC był zachowany w pasażach 4-6.



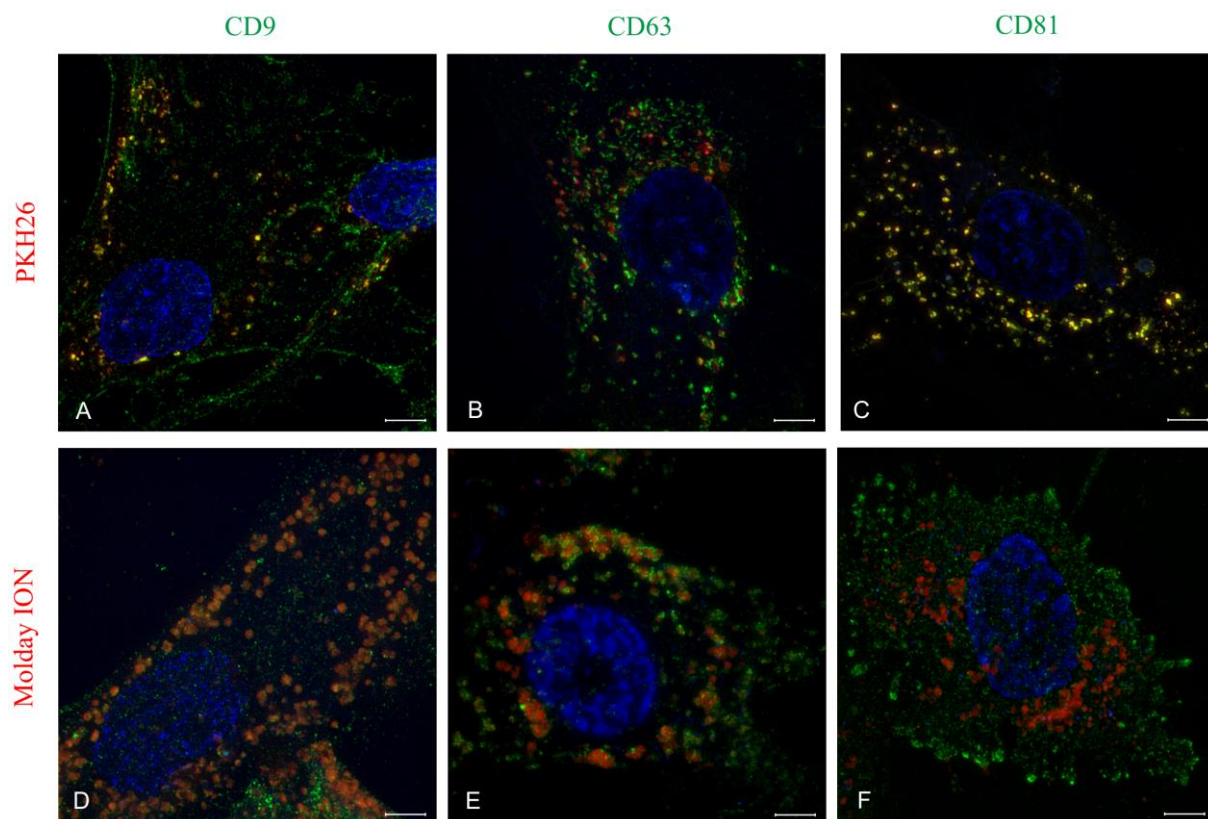
Ryc. 9. Obraz hBM-MSCs pozostających w hodowli *in vitro* widoczny w mikroskopie świetlnym w świetle przechodzącym (A,B) i w mikroskopie konfokalnym po zastosowaniu analizy immunocytochemicznej z użyciem przeciwciał: anty-STEM121 (C), anty-CD90 (D), anty-CD73 (E) i anty-CD44 (F) (kolor zielony). Jądra komórek wyznakowano dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 50µm



Ryc.10. Wykres przedstawia procentowy udział hBM-MSCs wykazujących obecność wybranych markerów. Wyniki badań przedstawiono, jako wartości średnie±SD, n=100

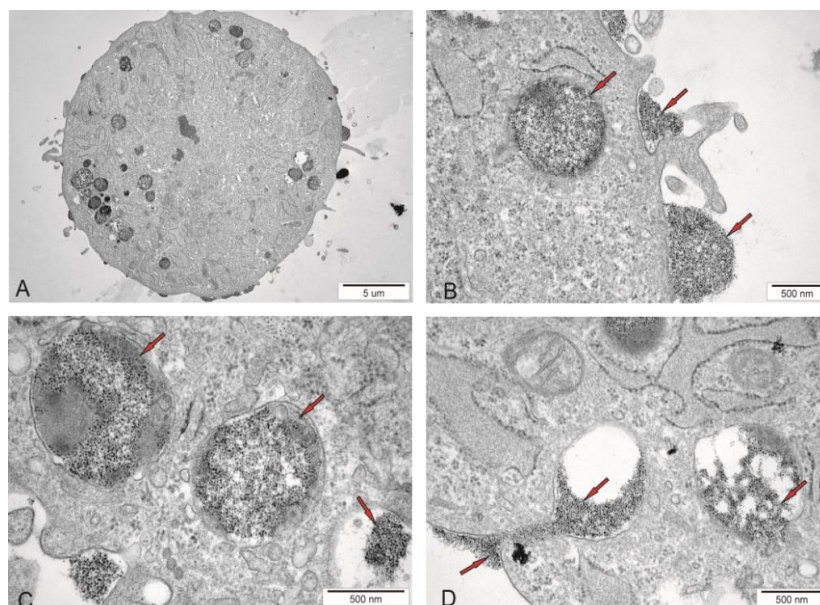
5.2. Analiza wewnątrzkomórkowych struktur w hBM-MSCs z zastosowaniem SR-SIM i TEM

Analiza mikroskopowa hBM-MSCs z wykorzystaniem superrozdzielczego systemu SIM wykazała, iż zastosowanie znaczników PKH26 oraz Molday ION umożliwiło wizualizację struktur w komórkach. Barwnik PKH26 był widoczny w błonach wewnątrzkomórkowych pęcherzyków i wykazywał kolokalizację z tetraspaninami: CD9, CD63, CD81 (markerami egzosomów), na co wskazuje żółty kolor wyznakowanych wewnątrzkomórkowych struktur (ryc.11A-C). Natomiast użyte do znakowania hBM-MSCs nanocząstki żelaza skoniugowane z rodaminą B (Molday ION) gromadziły się wewnątrz pęcherzyków komórkowych (**czerwony kolor**) na błonach, których widoczne były tetraspaniny (**zielone punkty**) (ryc.11D-F).



Ryc.11. Komórki hBM-MSCs znakowane PKH26 (A-C) lub Molday ION (D-F) (**kolor czerwony**). Analiza immunocytochemiczna wewnątrzkomórkowych pęcherzyków po zastosowaniu specyficznych przeciwciał identyfikujących tetraspaniny: anty-CD9 (A,D); anty-CD63 (B,E); anty-CD81 (C,F) (**kolor zielony**). Obraz widoczny w super rozdzielczym systemie obrazowania mikroskopowego (SR-SIM). Jądra komórek wyznakowano dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (**kolor niebieski**). Skala 50 μm

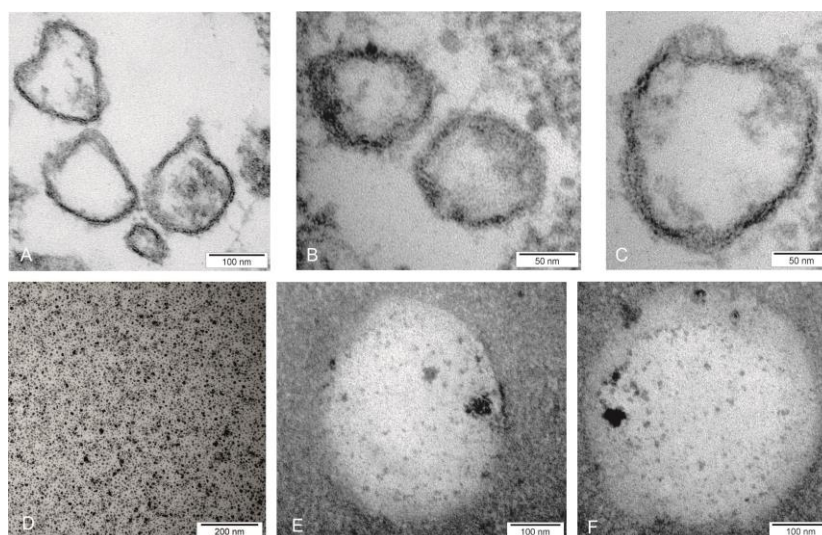
Obecność znacznika nanocząstek żelaza w wewnątrzkomórkowych pęcherzykach hBM-MSCs wyznakowanych Molday ION została potwierdzona w badaniach z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM). Nanocząstki żelaza były widoczne w pęcherzykach wewnątrz komórek hBM-MSCs (ryc.12A-C). Dodatkowo badania te pozwoliły na zobrazowanie procesu wnikania Molday ION przez błonę cytoplazmatyczną do wnętrza komórki podczas znakowania komórek (ryc.12D).



Ryc.12. Komórki hBM-MSCs po znakowaniu Molday ION. Reprezentatywny obraz widoczny w transmisyjnym mikroskopie elektronowym uwidacznia obecność nanocząstek żelaza w wewnątrzkomórkowych pęcherzykach widocznych w cytoplazmie hBM-MSCs wyznakowanych Molday ION (A-C) oraz proces wnikania nanocząstek żelaza do komórki i gromadzenie się ich w wewnątrzkomórkowych pęcherzykach (D).

5.3. Ocena pęcherzyków wyizolowanych z hBM-MSCs przy pomocy TEM

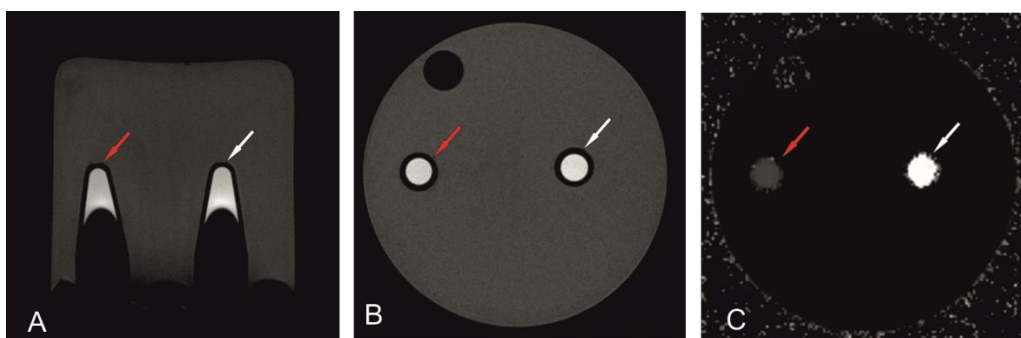
Analiza pęcherzyków uwalnianych przez hBM-MSCs (EVs) wykonana za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej wykazała, iż stanowią one heterogenną populację składającą się z większych mikropęcherzyków i mniejszych egzosomów różniących się wielkością i kształtem (ryc.13A-C). Ponadto badania przeprowadzone w TEM uwidoczniły, że EVs wyizolowane z hBM-MSCs wyznakowanych Molday ION zachowują nanocząstki żelaza również po ich izolacji z komórek (ryc.13E-F).



Ryc.13. Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki po ich izolacji z natywnych hBM-MSCs (A-C), nanoczątki żelaza skoniugowane z rodaminą B (D) oraz EVs wyizolowane z komórek wyznakowanych Molday ION (E-F). Reprezentatywny obraz widoczny w transmisyjnym mikroskopie elektronowym przedstawia heterogenną populację EVs składającą się z większych mikropęcherzyków i mniejszych egzosomów (A-C), nanonocząstki żelaza są obecne wewnątrz EVs po ich izolacji z wyznakowanych Molday ION hBM-MSCs (E-F)

5.4. Obrazowanie MR - EVs wyizolowanych z hBM-MSCs znakowanych Molday ION

Obrazowanie przy użyciu rezonansu magnetycznego (MRI) zewnątrzkomórkowych pęcherzyków umieszczonych w fantomach potwierdziło efektywność znakowania EVs nanocząstkami żelaza po ich izolacji z hBM-MSCs wyznakowanych Molday ION (ryc.14A). W obrazowaniu T2-weighted nie zaobserwowano znaczących zmian w intensywności sygnału dla EVs wyznakowanych Molday ION i EVs niewyznakowanych (ryc.14B), obrazowanie T2-map wykazało znaczącą zmianę w czasie relaksacji z 974 ms dla hBM-MSC-EVs niewyznakowanych do 253 ms dla hBM-MSC-EVs wyznakowanych Molday ION (ryc.14C). Wyniki te potwierdzają optymalne warunki znakowania hBM-MSCs i izolacji EVs, a także pozwalają określić minimalną liczbę wyznakowanych nanocząstek żelaza pęcherzyków niezbędną do otrzymania sygnału przy pomocy posiadanego przez nas aparatu MR.

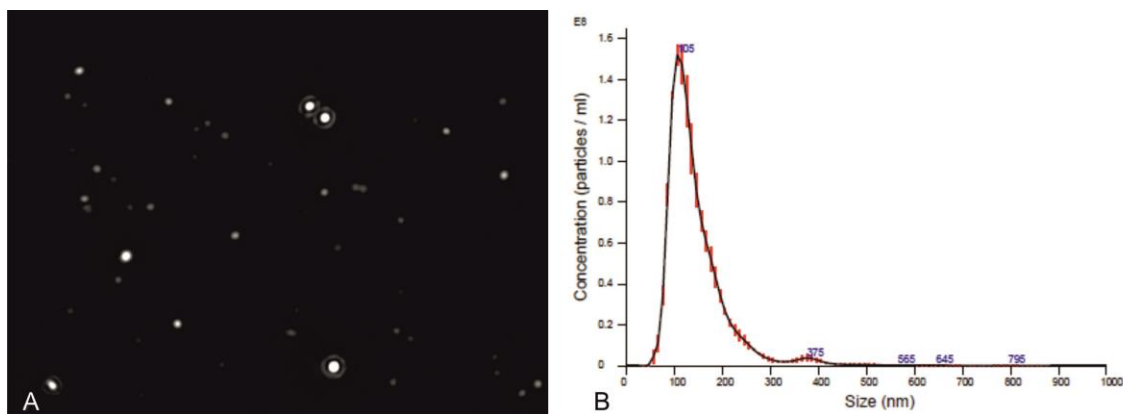


Ryc. 14. Obrazowanie MR *in vitro* fantomów zawierających EVs wyizolowane z hBM-MSCs wyznakowanych Molday ION (czerwona strzałka) lub natywnych (niewyznakowanych) hBM-MSC (biała strzałka). Detekcja EVs zawierających nanocząstki żelaza i EVs natywnych nie wykazała różnic w intensywności sygnału w obrazowaniu T2-weighted (B); różnice w czasie relaksacji analizowanych znakowanych i nieznakowanych EVs widoczne były w obrazowaniu T2-map (C).

5.5 Analiza liczby i wielkości EVs wyizolowanych z hBM-MSCs przy użyciu NanoSight

Analiza zewnątrzkomórkowych pęcherzyków za pomocą aparatury NanoSight pozwoliła na określenie ich wielkości i koncentracji. Wykonane badania potwierdziły wcześniejsze nasze obserwacje w mikroskopie elektronowym, że EVs wyizolowane z hBM-MSCs stanowią heterogenną populację (ryc.15A). Wyniki analizowanych przez nas EVs wykazały, iż wyizolowane z hBM-MSCs pęcherzyki składają się z dwóch subpopulacji: egzosomów/mniejszych mikropęcherzyków o średnicy 111.67 ± 11.55 nm oraz większych mikropęcherzyków o wielkości 398.33 ± 49.33 nm (ryc.15B), przy czym większość (około 80%) wszystkich zewnątrzkomórkowych pęcherzyków miała wielkość zawartą w przedziale pomiędzy 86.73 ± 1.61 nm a 218.60 ± 2.86 nm (Tabela 3).

Wykonane przy użyciu NanoSight pomiary pozwoliły określić również liczbę EVs otrzymanych po izolacji. Wyniki naszych badań wykazały, że średnia liczba EVs wyizolowanych z 5×10^6 hBM-MSCs wynosi $1.26 \times 10^9 \pm 1.84 \times 10^7$ /ml. Taka koncentracja odpowiadała 110.17 ± 24.00 EVs na ramkę odczytu oraz 134.87 ± 37.64 liczby centrów na ramkę odczytu (Tabela 4).



Ryc. 15. Analiza EVs przy pomocy NanoSight. Fragment nagrania wideo zarejestrowanego za pomocą NanoSight (A). Reprezentatywny wykres pokazujący liczbę i wielkość EVs, składającą się z dwóch subpopulacji pęcherzyków o średniej wielkości: 105 nm i 375 nm (B).

Tabela 3. Średnia wielkość EVs zanalizowanych przy pomocy NanoSight

Wielkość EVs					
średnia [nm]	moda [nm]	SD [nm]	D10 [nm]	D50 [nm]	D90 [nm]
154.37± 1.12	115.13± 1.59	69.90±0.38	86.73±1.61	125.23±0.57	218.60±2.86

*D10, D50 and D90 odpowiadają wartościom procentowym (10%, 50%, 90%) pęcherzyków mniejszych lub równych poszczególnym wartościom

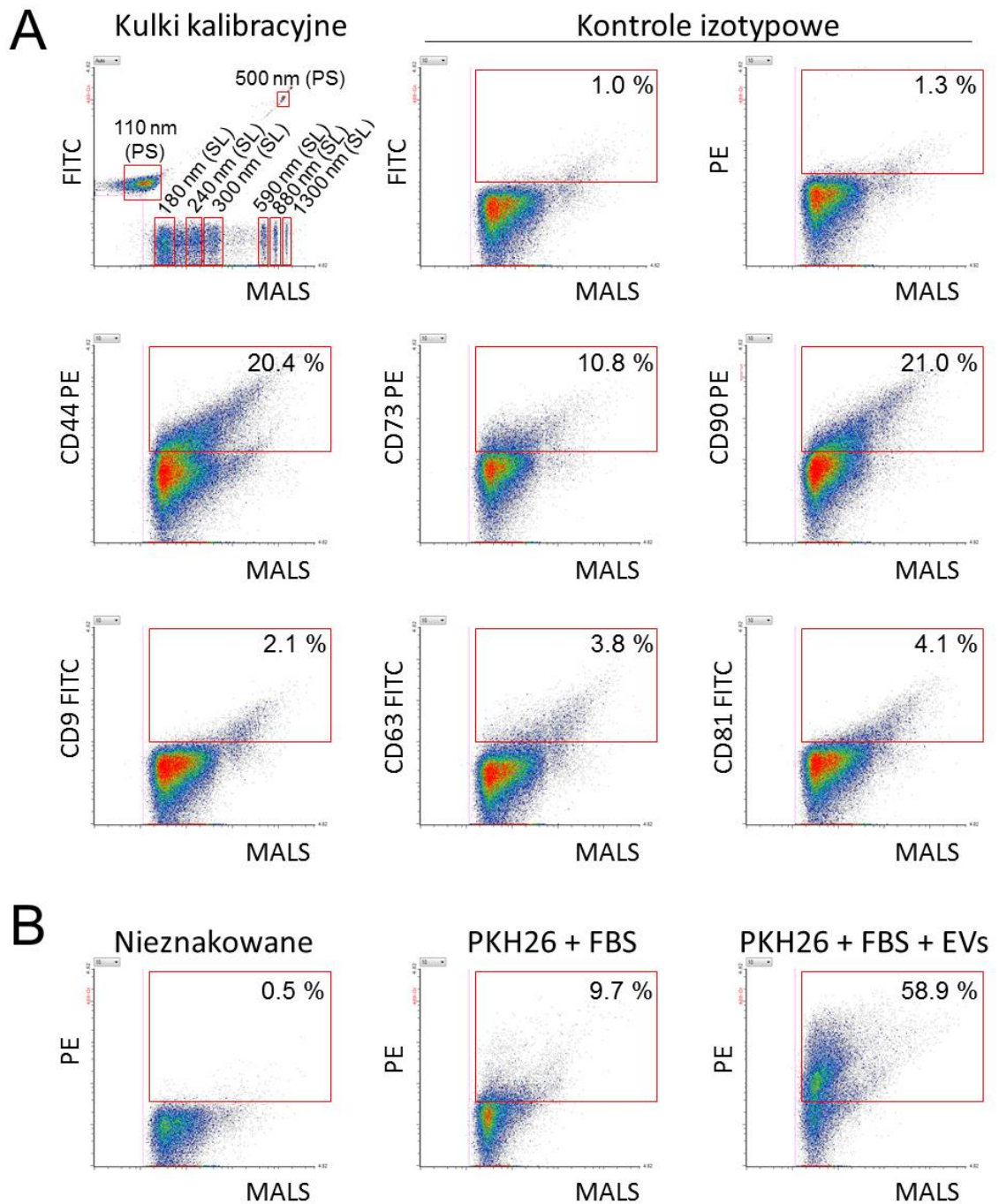
Tabela 4. Średnia liczba EVs zanalizowane za pomocą NanoSight

Liczba EVs		
Gęstość EVs/ml	Liczba EVs/ramkę odczytu	Liczba centrów/ramkę odczytu
1.26x10 ⁹ ±1.84x10 ⁷	110.17±24.00	134.87±37.64

5.6. Ocena EVs po ich izolacji z hBM-MSCs za pomocą wysokorozdzielczej cytometrii przepływowej

Analiza EVs w wysokorozdzielczym cytometrze przepływowym dedykowanym do oceny małych cząstek (ApoGee Flow Systems) wykazała, iż badane cząstki miały wielkość zawartą w przedziale pomiędzy 100 a 250 nm. Wyniki badań wykazały obecność markerów typowych dla mezenchymalnych komórek macierzystych, w tym CD44 (21.32±3.27%), CD90 (16.70±7.44%) i CD73 (8.75±2.03%), ekspresję tetraspanin (markery egzosomów): CD81 (2.85±0.87%), CD63 (2.58±1.36%) i CD9 (1.43±0.46%) w całej populacji EVs wyizolowanych z hBM-MSCs. (ryc.16A).

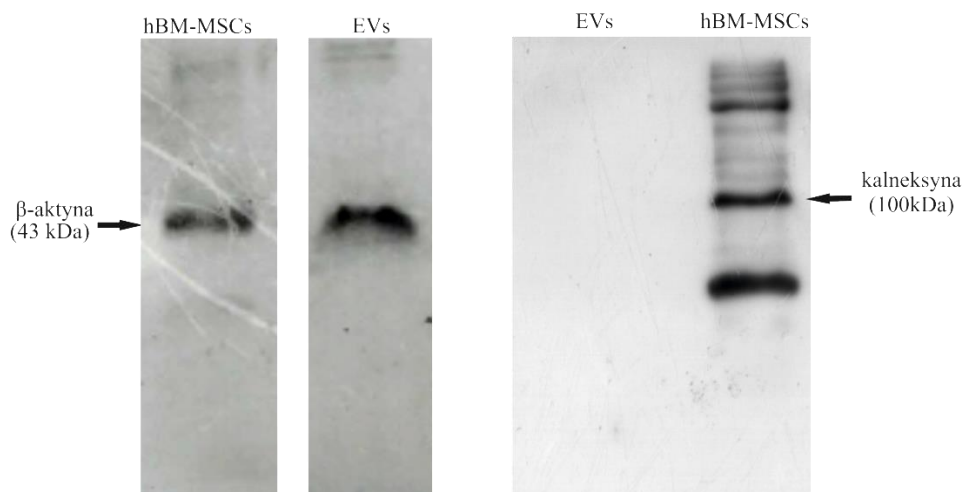
Ponadto badania przeprowadzone przy użyciu ApoGee potwierdziły efektywność znakowania wyizolowanych z hBM-MSCs pęcherzyków PKH26 *in vitro*. Wyniki analizy wykazały, iż po uwzględnieniu niespecyficznego znakowania FBS, 49.2% EVs było wyznakowanych PKH26 (ryc.16B).



Ryc. 16 Analiza EVs wyizolowanych z natywnych hBM-MSCs w wysokorozdzielczym cytometrze przepływowym ApoGee A50-Micro. Na rycinie przedstawiono reprezentatywne wykresy analizy procentowej zawartości EVs wykazujących obecność specyficznych markerów: CD44, CD73, CD90, CD9, CD63 i CD81 (A) oraz pozytywnych EVs ze znacznikiem PKH26 (MALS odpowiada relatywnej wielkości analizowanych próbek).

5.7. Analiza EVs wyizolowanych z hBM-MSCs za pomocą Western blot

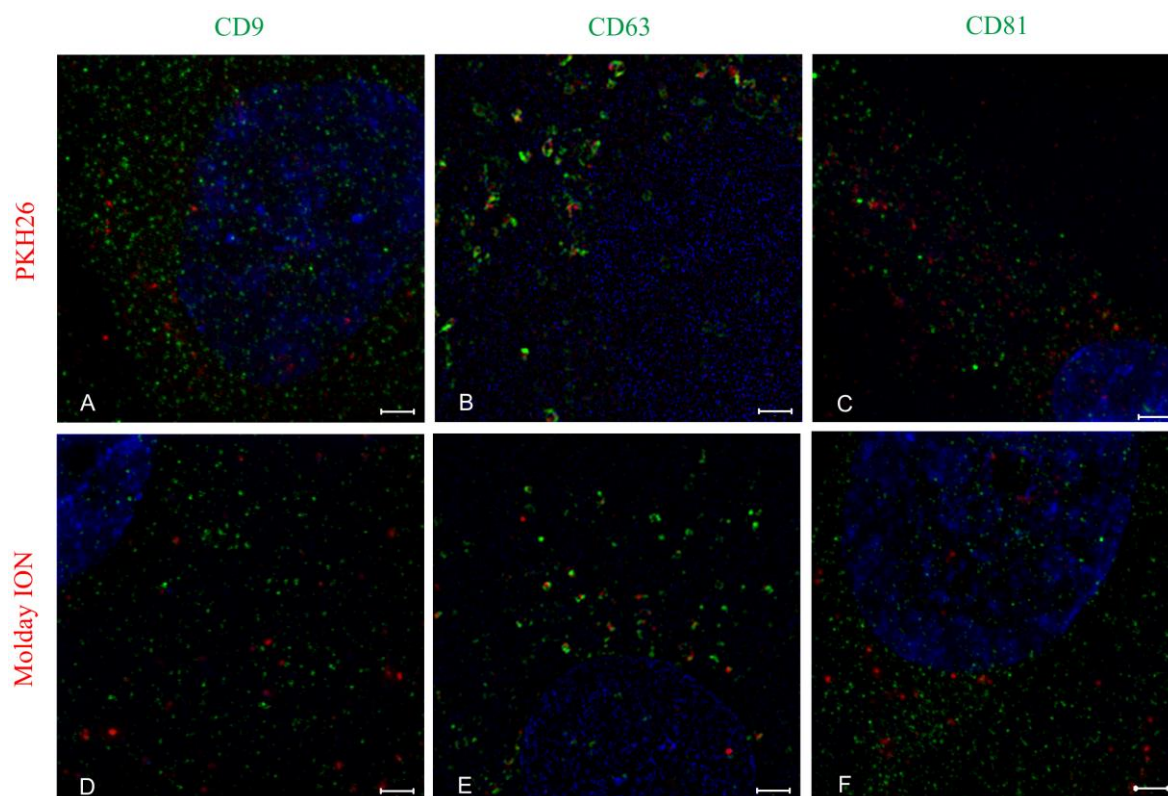
Analiza zewnątrzkomórkowych pęcherzyków metodą Western Blot poprzez kontrolne znakowanie β -aktyną potwierdziła poprawność izolacji EVs z hBM-MSCs, obie próbki EVs i hBM-MSCs wykazywały ekspresję tego markera. W celu sprawdzenia czystości populacji zewnątrzkomórkowych pęcherzyków przeprowadzono detekcję kalneksyny – białka obecnego na błonach komórkowych. Nie stwierdzono obecności tego markera w populacji EVs, co wskazuje na to, iż EVs wyizolowane z hBM-MSCs są czystą populacją, niezawierającą fragmentów błon komórkowych (ryc.17).



Ryc. 17. Analiza EVs przy pomocy metody Western Blot. EVs nie wykazują ekspresji kalneksyny, markera błon komórkowych obecnego w populacji hBM-MSCs.

5.8. Współhodowle EVs z hBM-MSCs

Aby sprawdzić, czy izolacja i znakowanie zewnątrzkomórkowych pęcherzyków nie wpłynęło na ich zdolność migracji do komórek, przeprowadzono współhodowle EVs wyznakowanych PKH26 lub Molday ION z hBM-MSCs w warunkach *in vitro*. Analiza, przeprowadzana przy udziale superdzielczej mikroskopii SIM, utrwalonych preparatów komórkowych po 24 godzinach współhodowli wykazała obecność EVs wewnątrz hBM-MSCs. Struktury, emitujące czerwony barwnik pochodzący od znaczników PKH26 lub Molday ION świadczą o istnieniu znakowanych EVs w komórkach. Częściowa ko-lokalizacja barwników PKH26 lub Molday ION z markerami egzozomów: CD9, CD63, CD81 (ryc.18), dodatkowo potwierdza powyższą obserwację, iż w hBM-MSCs znajdują się egzogenne EVs, które w warunkach współhodowli *in vitro* zasiedliły te komórki.



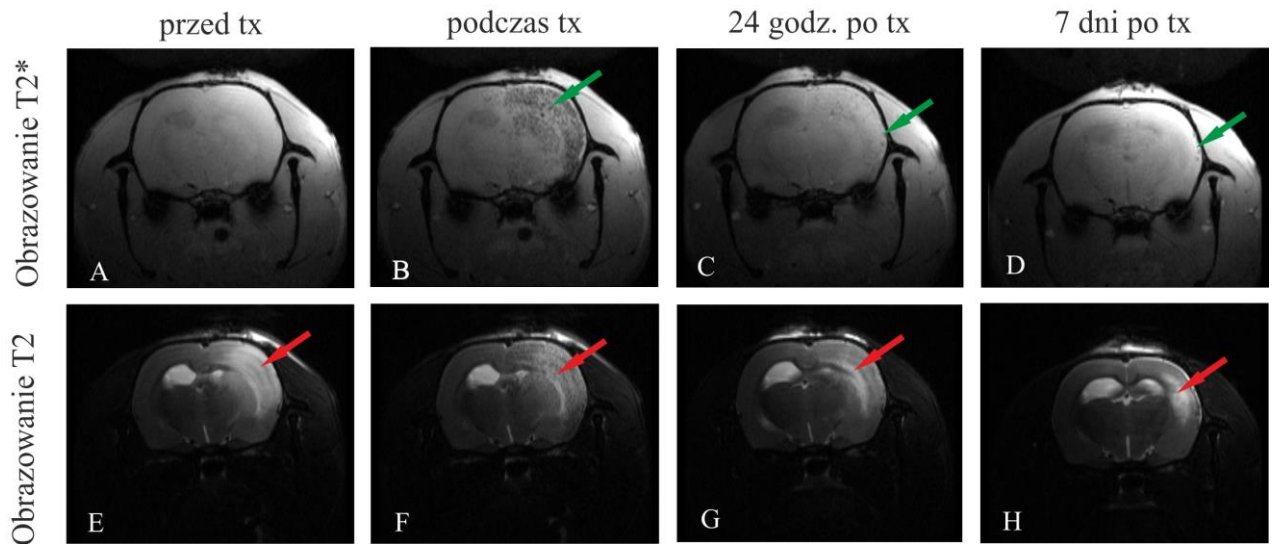
Ryc. 18 Komórki hBM-MSCs z widocznymi wewnątrz egzogennymi EVs znakowanymi PKH26 (A-C) lub Molday ION (D-F) (kolor czerwony). Analiza immunocytochemiczna EVs po zastosowaniu specyficznych przeciwciał identyfikujących tetraspaniny: anti-CD9 (A,D); anti-CD63 (B,E); anti-CD81 (C,F) (kolor zielony). Jądra komórek wyznakowano dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Zdjęcia wykonane w super rozdzielczym systemie obrazowania mikroskopowego (SR-SIM) po 24 godzinach współhodowli EVs i hBM-MSCs.). Skala 50 μm

5.9. Obrazowanie hBM-MSCs w mózgu szczurów w sekwencji czasowej po ich transplantacji (MRI)

Migracja przeszczepionych do tętnicy szyjnej hBM-MSCs, wyznakowanych Molday ION i stopień zasiedlania obszarów mózgu szczura było monitorowane *in vivo* w rezonansie magnetycznym podczas transplantacji (tx) komórek (w czasie rzeczywistym). Dodatkowo, obrazowanie mózgu w MRI przeprowadzono u tych samych szczurów 24 godziny i 7 dni po przeszczepie. Obrazowanie T2* pozwoliło lepiej ocenić obecność hBM-MSCs w mózgu szczura (ryc.19A-D), podczas kiedy obrazowanie T2 dodatkowo umożliwiło uwidocznienie obszaru uszkodzenia prawej półkuli mózgu szczura, przeprowadzone 2 dni przed transplantacją komórek poprzez stereotaktyczne podanie ouabainy do prążkowiec (ryc.19E-H).

Analiza w MRI w czasie rzeczywistym wykazała, że podane do prawej tętnicy szyjnej szczura hBM-MSCs migrowały podczas infuzji do prawej półkuli mózgu szczura i gromadziły się w okolicy uszkodzenia (ryc.19B,F). Wskazywał na to pośrednio generowany podczas MRI sygnał pochodzący z nagromadzenia się nanocząstek żelaza będących udziałem obecności hBM-MSCs wyznakowanych Molday ION (zwiększone zaciemnienie obrazu). Po upływie 24 godzin od transplantacji sygnał pochodzący z nanocząstek żelaza hBM-MSCs był w dalszym ciągu widoczny w prawej półkuli mózgu biorców przeszczepu, ale w dużo mniejszym natężeniu w porównaniu z obrazem rejestrowanym w momencie podania komórek (ryc.19.C,G). Po 7 dniach od przeszczepu hBM-MSCs znakowanych

Molday ION sygnał w mózgu szczura odbierany w MRI był jeszcze słabszy (ryc.19D,H), a po 14 dniach od podania komórek nie udało się zarejestrować detekcji sygnału u żadnego z obrazowanych w MRI biorców. Intensywność sygnału generowanego w MRI może pośrednio świadczyć o liczbie hBM-MSCs znakowanych Molday ION obecnych w analizowanej tkance.

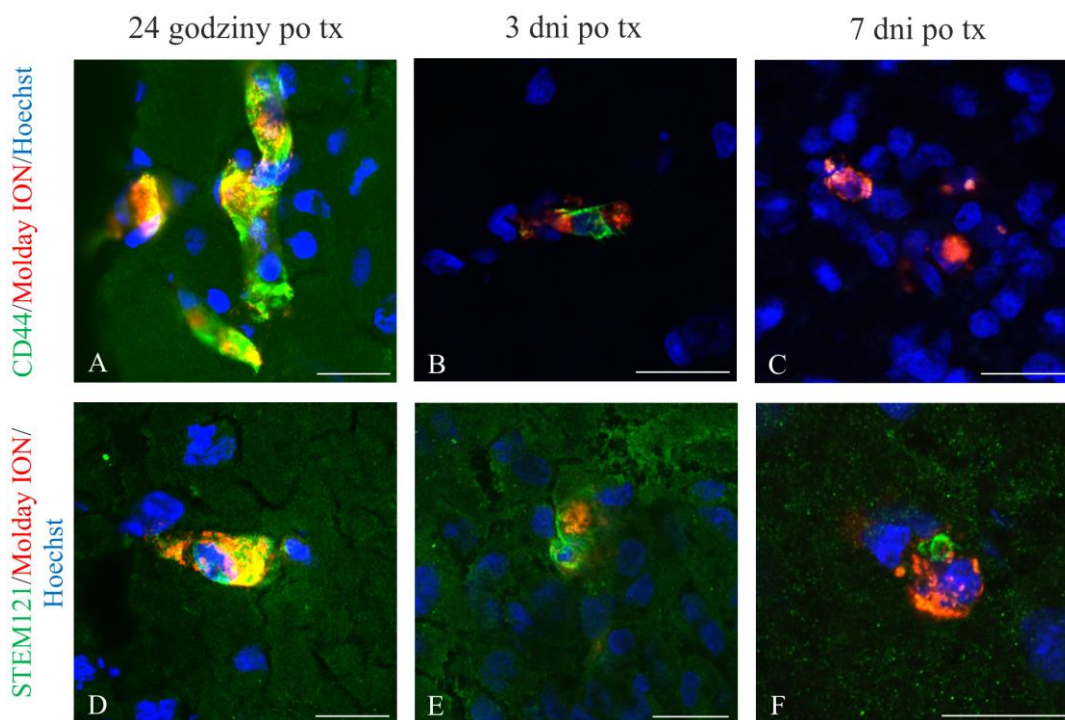


Ryc. 19. Analiza MRI mózgu szczura po uszkodzeniu prążkownia ouabainą i transplantacji hBM-MSCs wyznakowanych Molday ION podanych dotętniczo. Obrazowanie T2* (A-C) i T2 (D-F) mózgu szczurów biorców przeszczepu komórek: w czasie rzeczywistym (podczas infuzji komórek) (B,F) oraz po 24 godzinach (C,G) i 7 dniach (D,H) od momentu transplantacji (tx) hBM-MSCs. Zielonymi strzałkami zaznaczono miejsca, w których widoczne jest zaciemnienie obrazu wynikające z nagromadzenia nanocząstek żelaza generujących sygnał w MRI, czerwonymi strzałkami - obszar uszkodzenia mózgu.

5.10. Ocena immunohistochemiczna hBM-MSCs obecnych po ich przeszczepie w mózgu

W celu potwierdzenia obecności przeszczepionych dotętniczo hBM-MSCs znakowanych Molday ION w obrębie mózgu szczura wykonano badania immunohistochemiczne tkanki: 24 godziny, 3 i 7 dni po transplantacji komórek.

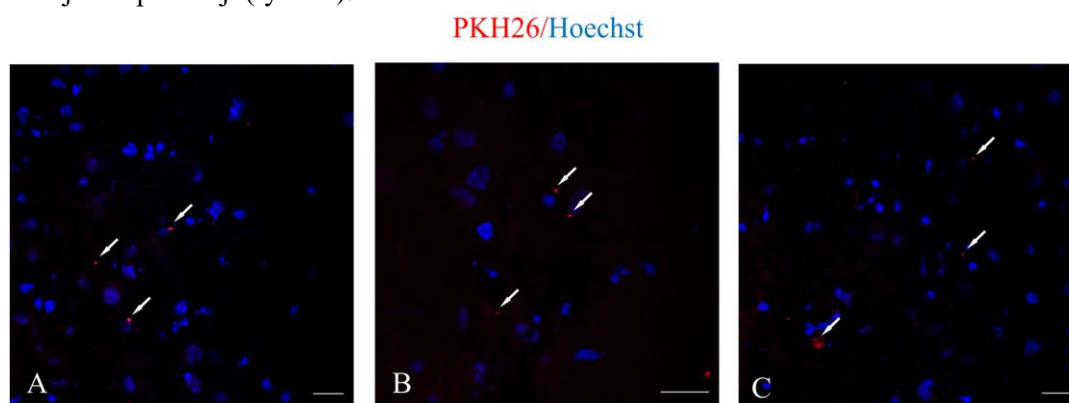
Barwienia z zastosowaniem specyficznych przeciwciał identyfikujących komórki ludzkie potwierdziły obecność komórek dawcy w mózgu biorców przeszczepu. Komórki Molday ION-pozytywne oceniane w tkance szczura po upływie 24 godzin, 3 i 7 dni od transplantacji wykazywały jednocześnie ko-ekspresję markerów: CD44 (ryc.20 A-C) lub STEM121 (ryc.20 D-F).



Ryc. 20. Obraz w mikroskopie konfokalnym hBM-MSCs wyznakowanych przyżyciowo Molday ION (kolor czerwony) widocznych w ipsilateralnej półkuli mózgu szczura po dotętnicznej transplantacji. Analiza immunohistochemiczna komórek po zastosowaniu przeciwciał: anti-CD44 specyficznych dla komórek MSCs (A-C) i anti-STEM121 markera ludzkich komórek (D-F) (kolor zielony). Jądra komórek wyznakowano dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 20 μm

5.11. Obecność EVs wyznakowanych PKH26 w mózгах szczurów po dotętnicznej transplantacji

W celu detekcji przeszczepianych EVs, izolowanych z hBM-MSCs i znakowanych PKH26 przeprowadzono badania immunohistochemiczne. Analiza skrawków mózgu szczurów, biorców EVs, u których wcześniej wykonano uszkodzenie tkanki ouabainą, przeprowadzona w mikroskopie konfokalnym, wykazała obecność skupisk EVs w prawej półkuli mózgu szczura 24 godziny po ich dotętnicznej transplantacji (ryc. 21).

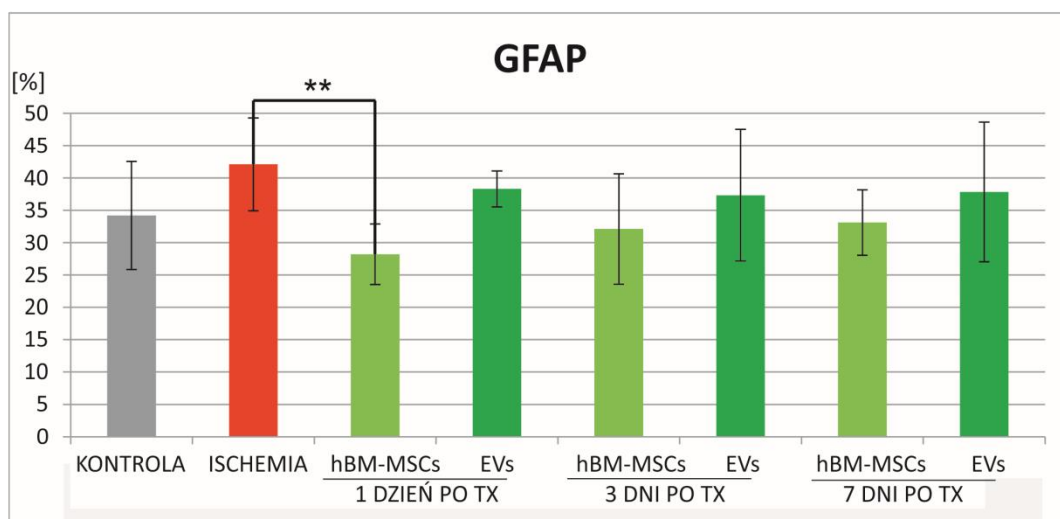
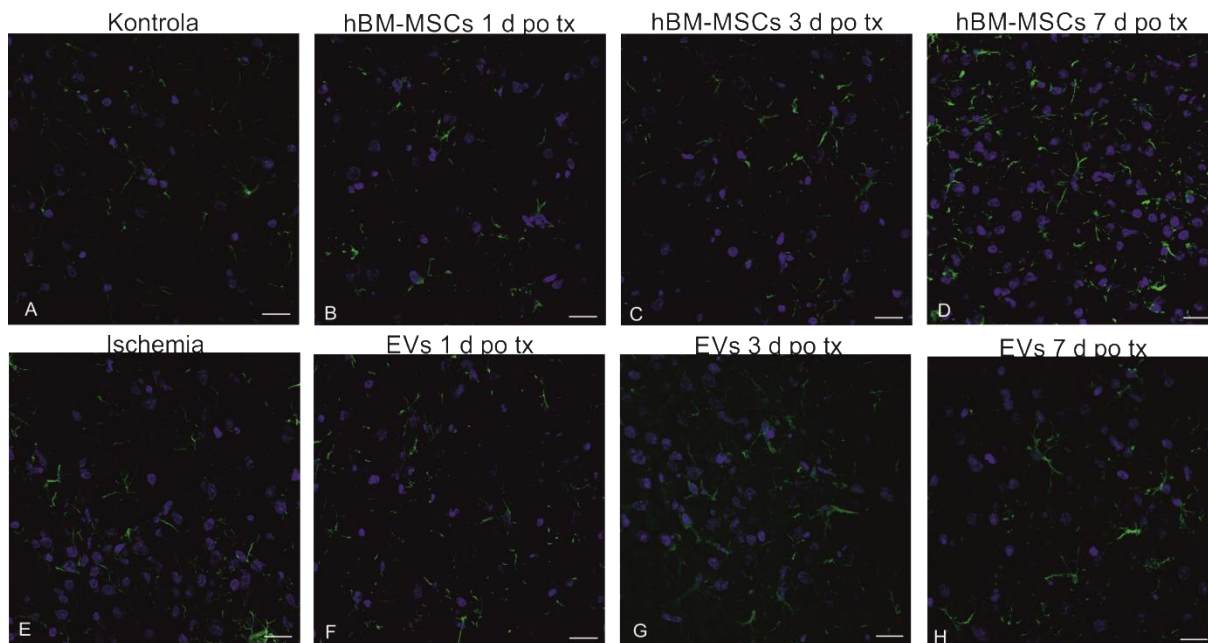


Ryc. 21. Wyznakowane przyżyciowo EVs barwnikiem PKH26 (kolor czerwony) widoczne po transplantacji w ipsilateralnej półkuli mózgu szczura. Obraz widoczny w mikroskopie konfokalnym po 24 godz. od podania EVs. Jądra komórek wyznakowano dodatkowo barwnikiem Hoechst 33258 (kolor niebieski). Skala 20 μm

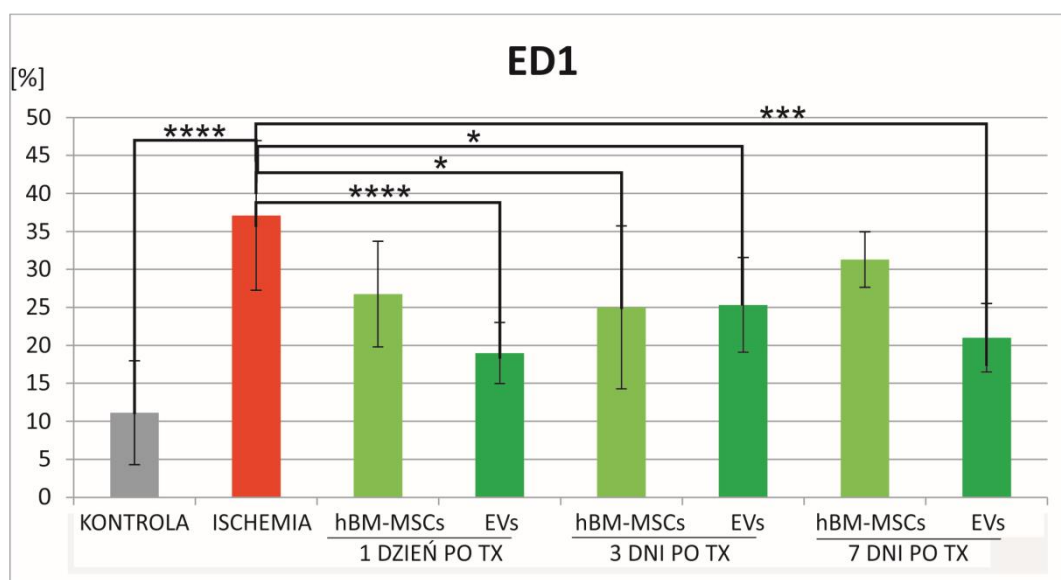
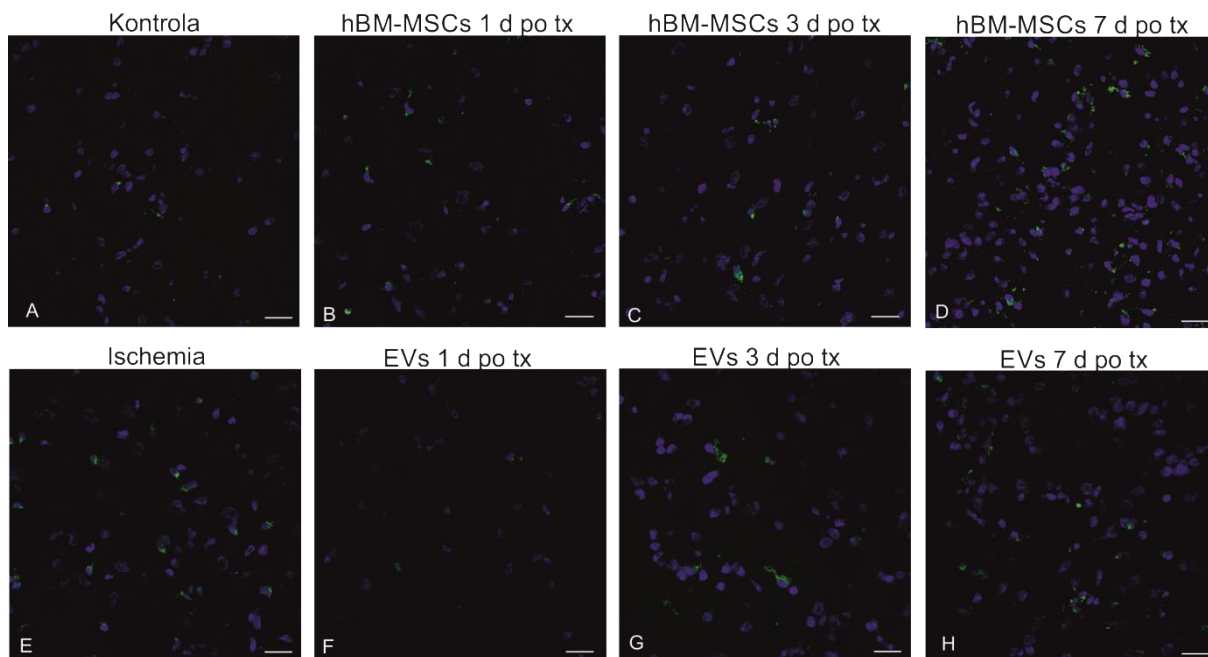
5.12. Analiza efektorów odpowiedzi immunologicznej w mózgu szczurów w poszczególnych grupach eksperymentalnych

Analiza wybranych komórek immunologicznie czynnych w mózgu szczurów wykazała, iż w wyniku uszkodzenia prądkowania ouabainą dochodzi do zwiększenia liczby niektórych populacji w porównaniu ze szczurami zdrowymi, w tym: komórek mikrogleju ED1⁺ (37.1±9.9% vs 11.1±6.8; p <0.0001), leukocytów CD45RA⁺ (59.1±9.9% vs 44.4±10.4; p <0.01) oraz limfocytów T CD8 (8.1±3.4% vs 1.4±1.2%; p <0.001).

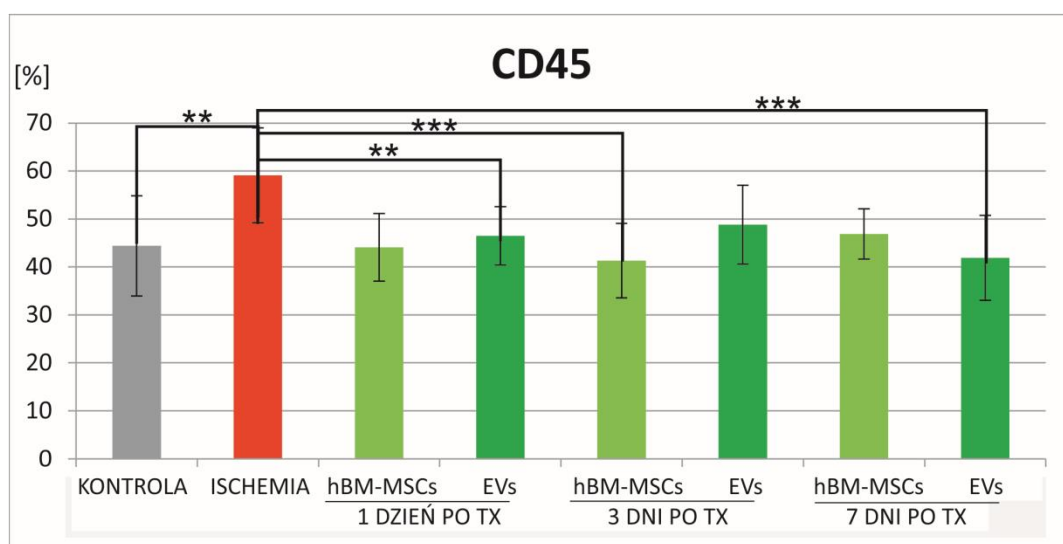
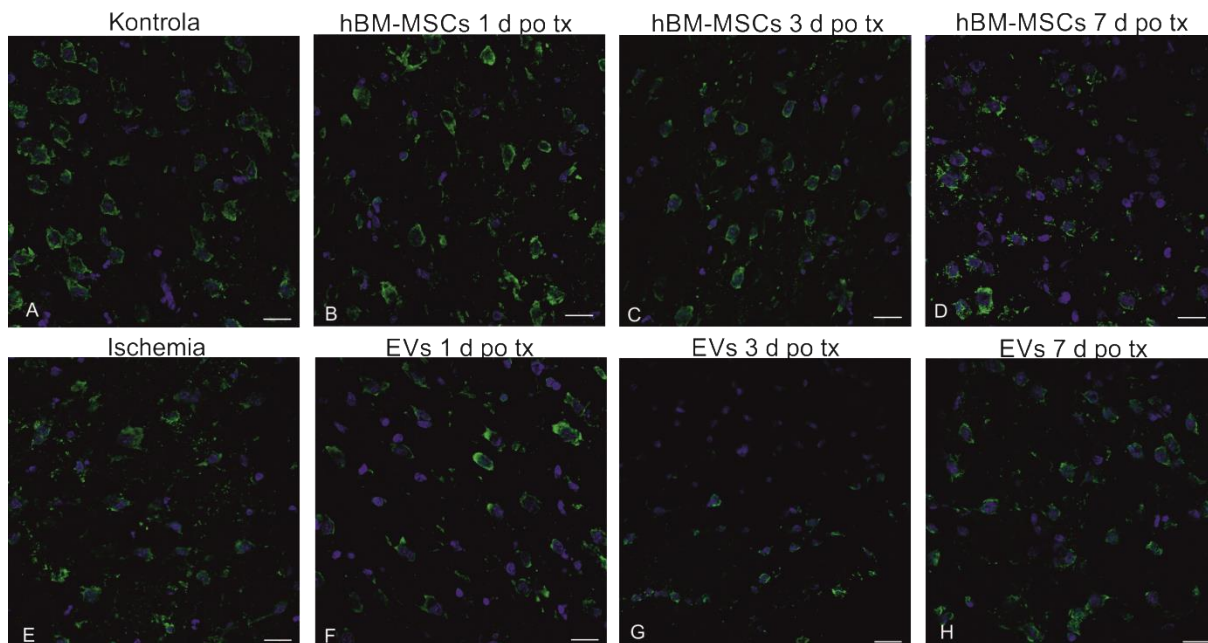
Podanie komórek lub wyizolowanych z nich pęcherzyków zwierzętom po ischemii miało różny wpływ na komórki wrodzonej bądź adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej w mózgu biorców, wywołanej uszkodzeniem prądkowia. Transplantacja hBM-MSCs powodowała zmniejszenie aktywacji komórek GFAP⁺ w stosunku do zwierząt po podaniu ouabainy, ale nie poddanych transplantacji, obserwowane 24 godziny po przeszczepie komórek (28.2±4.7% vs 42.1±7.2%; p<0.01) (ryc.22). Przeszczep hBM-MSCs powodował obniżenie liczby komórek mikrogleju widoczne po 3 dniach od transplantacji (37.1±9.9% vs 25.0±10.71%; p<0.05). Natomiast podanie EVs skutkowało zmniejszeniem liczby komórek ED1⁺ we wszystkich punktach czasowych obserwacji, odpowiednio po 24 godzinach (37.1±9.9% vs 19±4.01%; p<0.0001), 3 dniach (37.1±9.9% vs 25.3±6.2%; p<0.05) i 7 dniach od transplantacji (37.1±9.9% vs 21±4.5%; p<0.001) (ryc.23). Analiza leukocytów wykazała, że infuzja hBM-MSCs prowadzi do obniżenia liczby komórek CD45RA⁺ w mózgu szczura po 3 dniach od przeszczepu (59.1±9.9% vs 41.3±7.7%; p<0.001), a w przypadku podania wyizolowanych z komórek mezenchymalnych pęcherzyków zmniejszenie liczby komórek CD45RA⁺ obserwuje się po 24 godz (59.1±9.9% vs 46.5±6.1%; α <0.01) oraz 7 dniach (59.1±9.9% vs 41.9±8.9%; α <0.001) od transplantacji (ryc.24). W populacji limfocytów T CD5⁺ w mózgu biorców przeszczepów EVs odnotowano wzrost liczby tych komórek widoczny po 3 dniach od transplantacji (18.6±7.1% vs 34±7.9%; α <0.001) (ryc.25). Podanie hBM-MSCs powodowało obniżenie limfocytów T CD8⁺ po 3 dniach od przeszczepu (8.1±3.4% vs 3.1±2.5; p<0.05), a w przypadku EVs zmniejszenie liczby komórek CD8⁺ obserwowano 24 godziny (8.1±3.4% vs 2.8±1.7%; p<0.01) i 7 dni po ich dotętniczej infuzji (8.1±3.4% vs 3.4±3.0; p<0.05) (ryc.27). W mózgu biorców przeszczepów otrzymujących hBM-MSCs lub wyizolowane z nich EVs nie było zmian liczbowych w populacji limfocytów CD4⁺ czy komórek CD15⁺, co uwidoczniło odpowiednio na wykresach (ryc. 26 i 28).



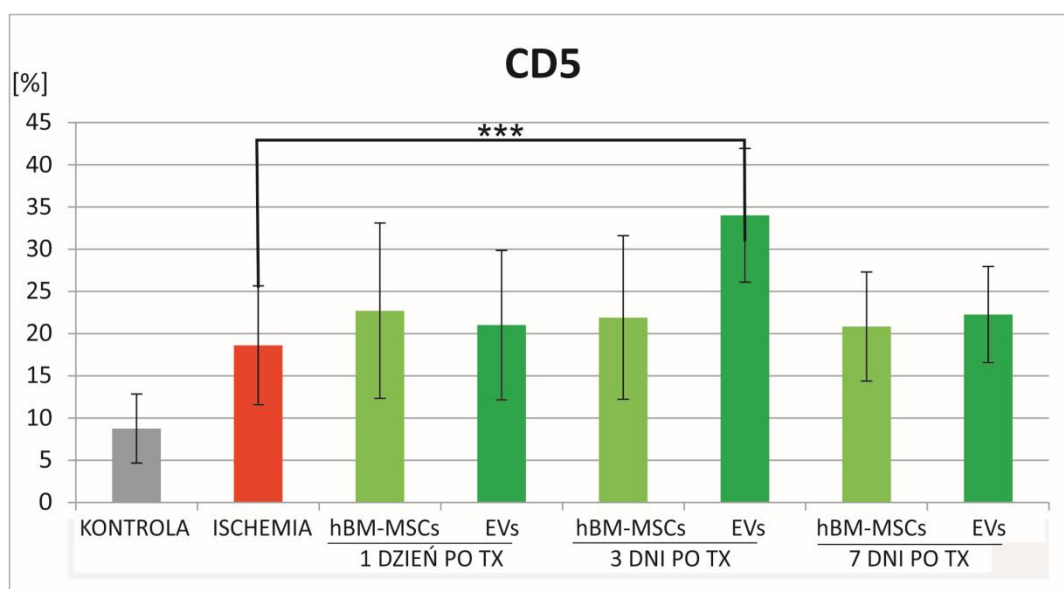
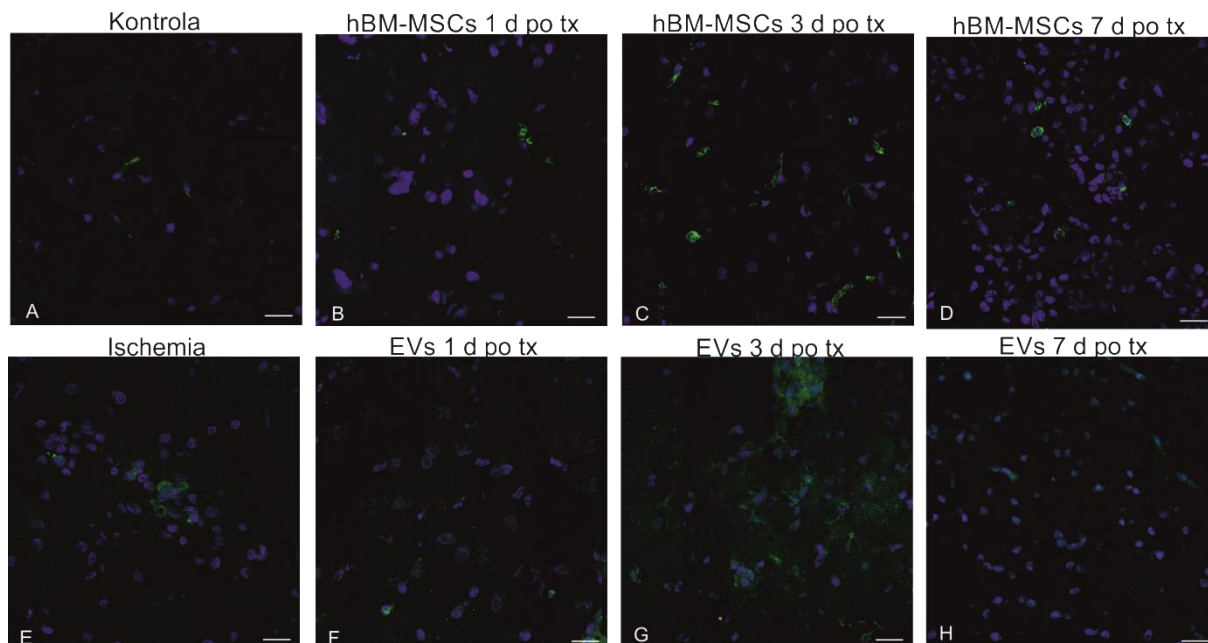
Ryc. 22. Analiza immunohistochemiczna astrocytów w ipsilateralnej półkuli mózgu: szczura zdrowego (A), 48 godzin po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą (E) oraz po 1,3 i 7 dniach od dotętniczej transplantacji hBM-MSCs (B-D) lub EVs (F-H). Wykres przedstawia procentowy udział komórek GFAP⁺ w poszczególnych grupach zwierząt (słupki szary – szczury zdrowe, słupki czerwony – zwierzęta 48 godzin po uszkodzeniu mózgu ouabainą, słupki jasnozielone i ciemnozielone – zwierzęta z uszkodzeniem mózgu po transplantacji hBM-MSCs lub EVs oceniane w sekwencji czasowej). Wyniki badań przedstawione, jako wartości średnie \pm SD., n=6, ** p<0.01



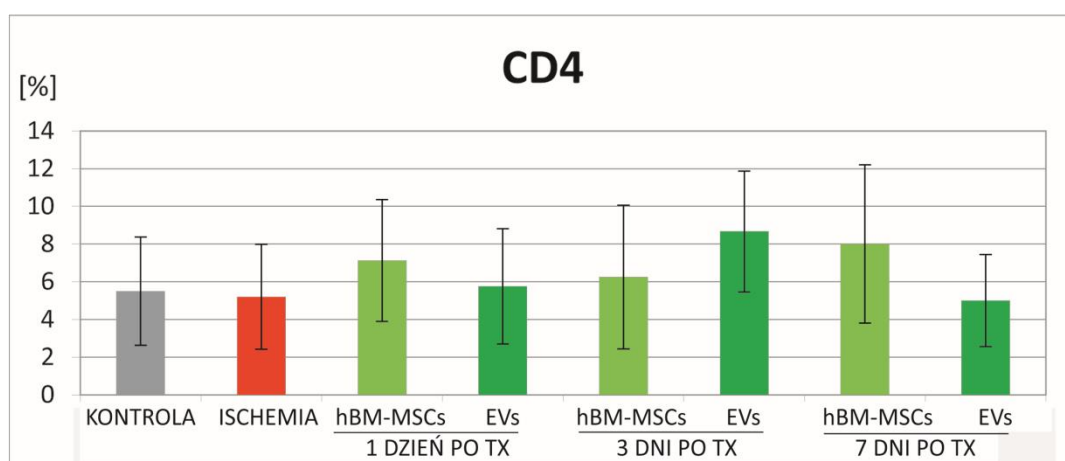
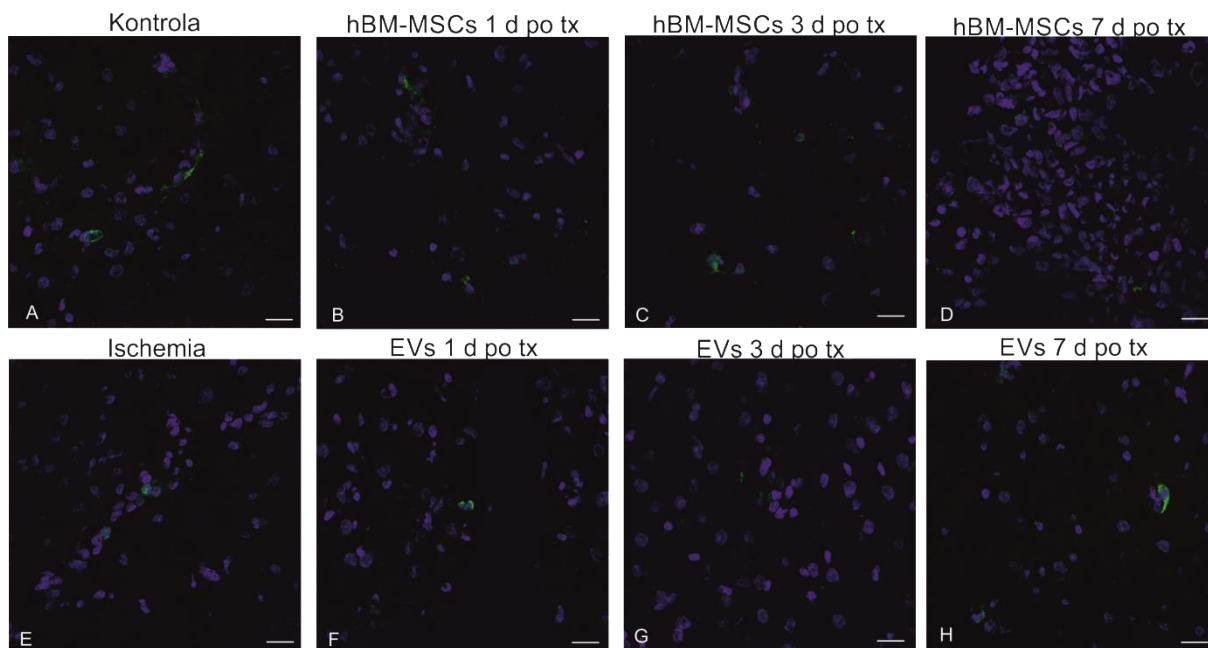
Ryc. 23. Analiza immunohistochemiczna komórek mikrogleju w ipsilateralnej półkuli mózgu: szczura zdrowego (A), 48 godzin po uszkodzeniu prążkownia ouabainą (E) oraz po 1,3 i 7 dniach od dotętnicznej transplantacji hBM-MSCs (B-D) lub EVs (F-H). Wykres przedstawia procentowy udział komórek ED⁺ w poszczególnych grupach zwierząt (słupki szary – szczury zdrowe, słupki czerwony – zwierzęta 48 godzin po uszkodzeniu mózgu ouabainą, słupki jasnozielone i ciemnozielone – zwierzęta z uszkodzeniem mózgu po transplantacji hBM-MSCs lub EVs oceniane w sekwencji czasowej). Wyniki badań przedstawione, jako wartości średnie ±SD, n=6, * p<0.05; *** p<0.001; ****p<0.0001



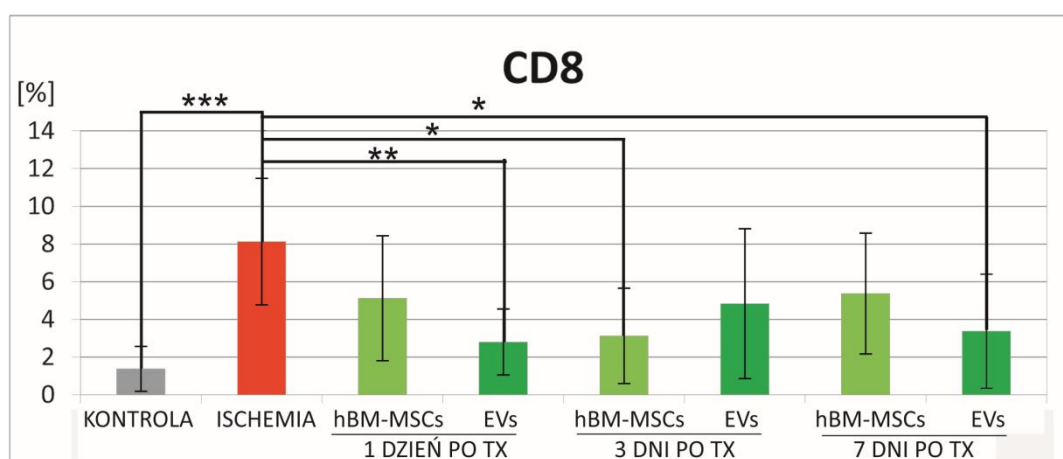
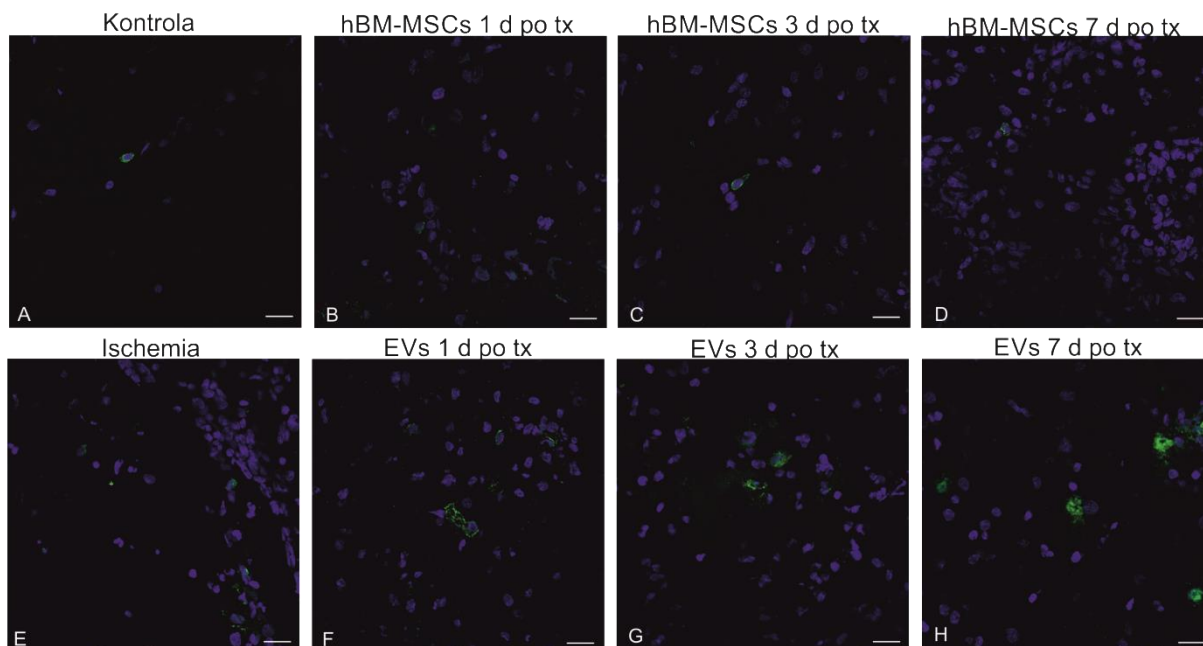
Ryc. 24 Analiza immunohistochemiczna leukocytów w ipsilateralnej półkuli mózgu: szczura zdrowego (A), 48 godzin po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą (E) oraz po 1,3 i 7 dniach od dotętnicznej transplantacji hBM-MSCs (B-D) lub EVs (F-H). Wykres przedstawia procentowy udział komórek CD45RA+ w poszczególnych grupach zwierząt (słupki szary – szczury zdrowe, słupki czerwony – zwierzęta 48 godzin po uszkodzeniu mózgu ouabainą, słupki jasnozielone i ciemnozielone – zwierzęta z uszkodzeniem mózgu po transplantacji hBM-MSCs lub EVs oceniane w sekwencji czasowej). Wyniki badań przedstawione, jako wartości średnie \pm SD, n=6, ** p<0.01; *** p<0.001



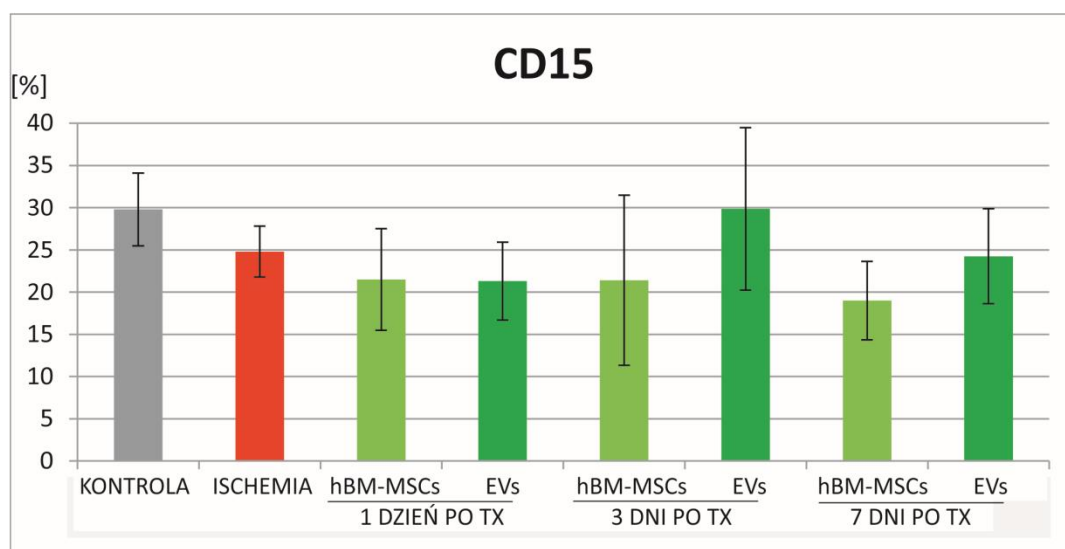
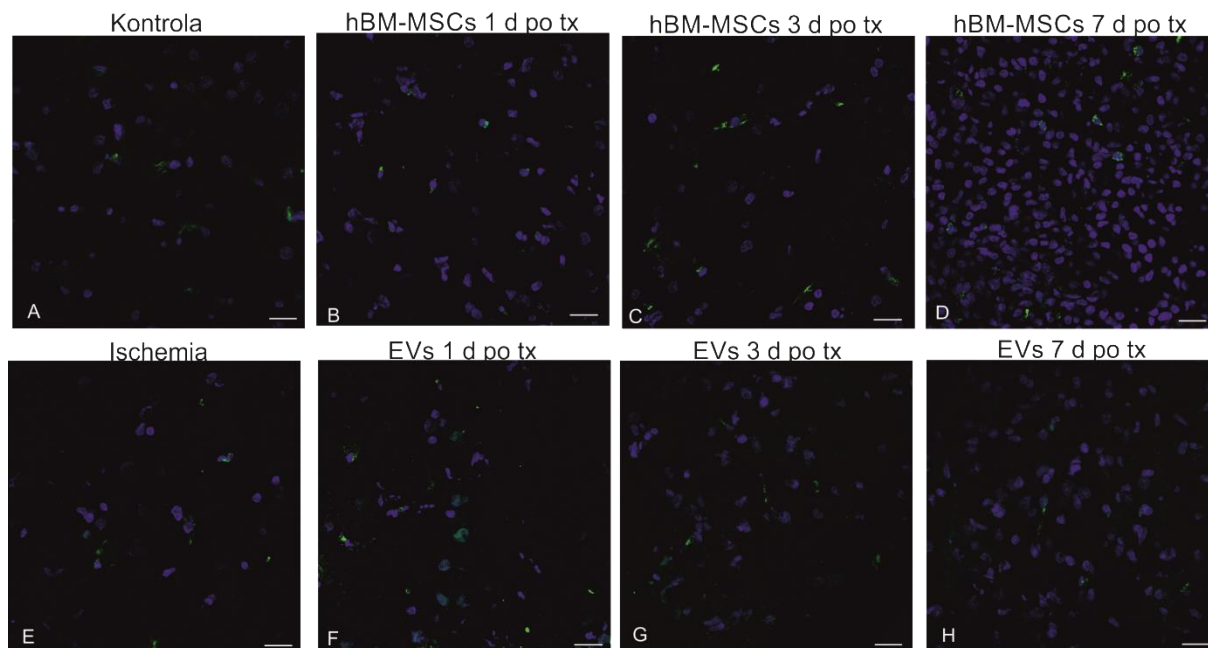
Ryc. 25. Analiza immunohistochemiczna limfocytów T w ipsilateralnej półkuli mózgu: szczura zdrowego (A), 48 godzin po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą (E) oraz po 1,3 i 7 dniach od dotętnicznej transplantacji hBM-MSCs (B-D) lub EVs (F-H). Wykres przedstawia procentowy udział komórek CD5⁺ w poszczególnych grupach zwierząt (słupki szary – szczury zdrowe, słupki czerwony – zwierzęta 48 godzin po uszkodzeniu mózgu ouabainą, słupki jasnozielone i ciemnozielone – zwierzęta z uszkodzeniem mózgu po transplantacji hBM-MSCs lub EVs oceniane w sekwencji czasowej). Wyniki badań przedstawione, jako wartości średnie ±SD, n=6, *** p<0.001



Ryc. 26. Analiza immunohistochemiczna limfocytów T CD4⁺ w ipsilateralnej półkuli mózgu: szczura zdrowego (A), 48 godzin po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą (E) oraz po 1,3 i 7 dniach od dotętnicznej transplantacji hBM-MSCs (B-D) lub EVs (F-H). Wykres przedstawia procentowy udział komórek CD4⁺ w poszczególnych grupach zwierząt (słupki szary – szczury zdrowe, słupki czerwony – zwierzęta 48 godzin po uszkodzeniu mózgu ouabainą, słupki jasnozielone i ciemnozielone – zwierzęta z uszkodzeniem mózgu po transplantacji hBM-MSCs lub EVs oceniane w sekwencji czasowej). Wyniki badań przedstawione, jako wartości średnie ±SD, n=6



Ryc. 27. Analiza immunohistochemiczna limfocytów T CD8⁺ w ipsilateralnej półkuli mózgu: szczura zdrowego (A), 48 godzin po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą (E) oraz po 1,3 i 7 dniach od dotętnicznej transplantacji hBM-MSCs (B-D) lub EVs (F-H). Wykres przedstawia procentowy udział komórek CD8⁺ w poszczególnych grupach zwierząt (słupki szary – szczury zdrowe, słupki czerwony – zwierzęta 48 godzin po uszkodzeniu mózgu ouabainą, słupki jasnozielone i ciemnozielone – zwierzęta z uszkodzeniem mózgu po transplantacji hBM-MSCs lub EVs oceniane w sekwencji czasowej). Wyniki badań przedstawione, jako wartości średnie ±SD, n=6, * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001



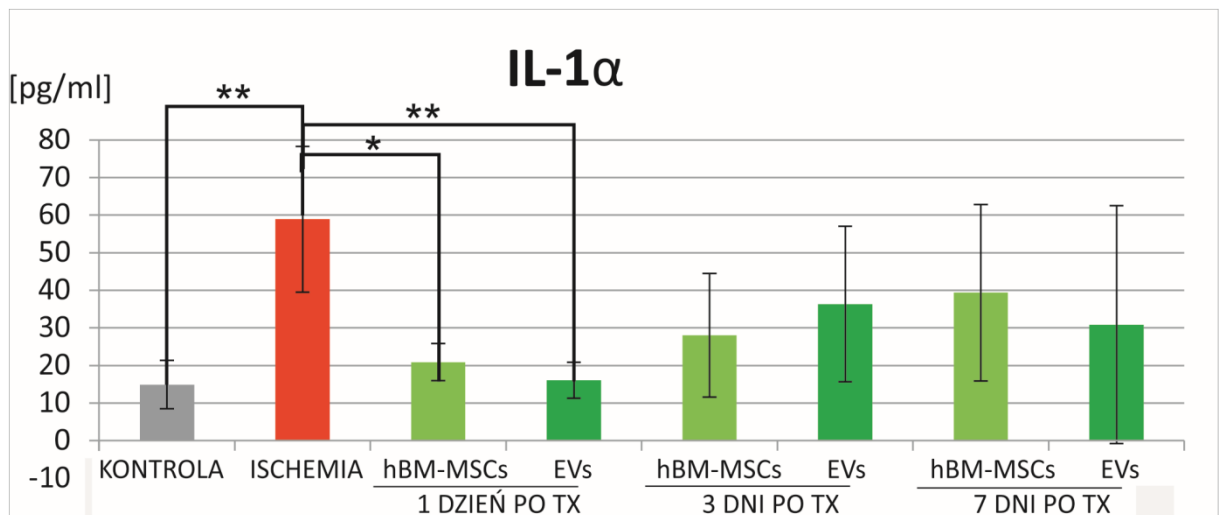
Ryc. 28. Analiza immunohistochemiczna neutrofilów w ipsilateralnej półkuli mózgu: szczura zdrowego (A), 48 godzin po uszkodzeniu prążkowiec ouabainą (E) oraz po 1,3 i 7 dniach od dotętnicznej transplantacji hBM-MSCs (B-D) lub EVs (F-H). Wykres przedstawia procentowy udział komórek CD15⁺ w poszczególnych grupach zwierząt (słupki szary – szczury zdrowe, słupki czerwony – zwierzęta 48 godzin po uszkodzeniu mózgu ouabainą, słupki jasnozielone i ciemnozielone – zwierzęta z uszkodzeniem mózgu po transplantacji hBM-MSCs lub EVs oceniane w sekwencji czasowej). Wyniki badań przedstawione, jako wartości średnie \pm SD, n=6

5.13. Analiza mediatorów zapalnych w mózgu szczurów w poszczególnych grupach eksperymentalnych

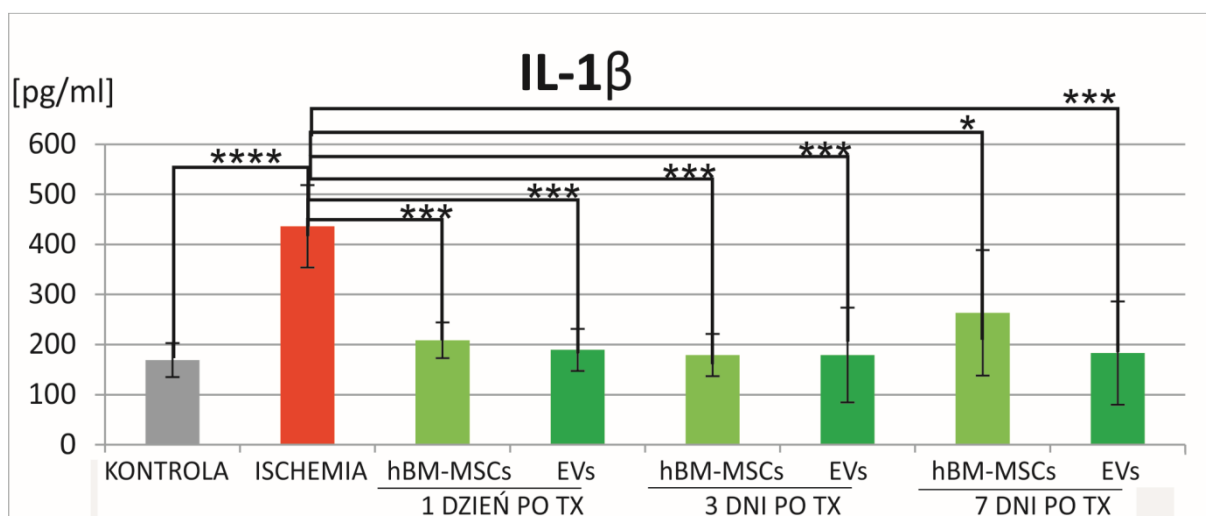
Analiza poziomu cytokin w homogenatach mózgu szczurów z zastosowaniem platformy BioPlexPro w technologii Luminex (BioRad) wykazała, iż w wyniku uszkodzenia mózgu ouabainą dochodzi do istotnej statystycznie aktywacji cytokin prozapalnych: IL-1 α ($p < 0.01$), IL-1 β ($p < 0.0001$), IL-6 ($p < 0.0001$) oraz TGF- β 2 ($p < 0.001$). Zmiany powstające w wyniku ischemii prowadziły do istotnego statystycznie podwyższenia poziomu chemokin: CXCL1 ($p < 0.0001$), MIP-1alpha ($p < 0.0001$), MIP-3alpha ($p < 0.05$) i MCP-1 ($p < 0.0001$).

Wyniki badań przeprowadzonych u szczurów po uszkodzeniu prądkowia ouabainą wykazały, iż przeszczep hBM-MSCs lub EVs prowadzi do obniżenia poziomu cytokin prozapalnych obserwowanego po ischemii. W wyniku transplantacji komórek lub wyizolowanych z nich pęcherzyków dochodzi do spadku aktywowanej IL-1 α po 24 godzinach od infuzji (ryc.29). Podanie hBM-MSCs lub EVs powoduje zmniejszenie ilości wydzielanej IL-1 β we wszystkich punktach czasowych obserwacji zwierząt eksperymentalnych (ryc.30). Podobnie widoczny jest spadek poziomu IL-6, wysoce znamieny ($p < 0.0001$) zarówno w przypadku transplantacji komórek jak i pochodzących z nich pęcherzyków (ryc.31). U biorców przeszczepu hBM-MSCs obserwuje się obniżenie IL-4 po 3 dniach od zabiegu transplantacji. Po dotętnicznym podaniu EVs niższy poziom IL-4, w porównaniu do ilości IL-4 w mózgu zwierząt po ischemii, widoczny jest 24 godziny i 7 dni po infuzji (ryc.32). Podobnie przeszczep EVs powoduje zmniejszenie ilości IFN- γ notowane 24 godziny po transplantacji (ryc.33).

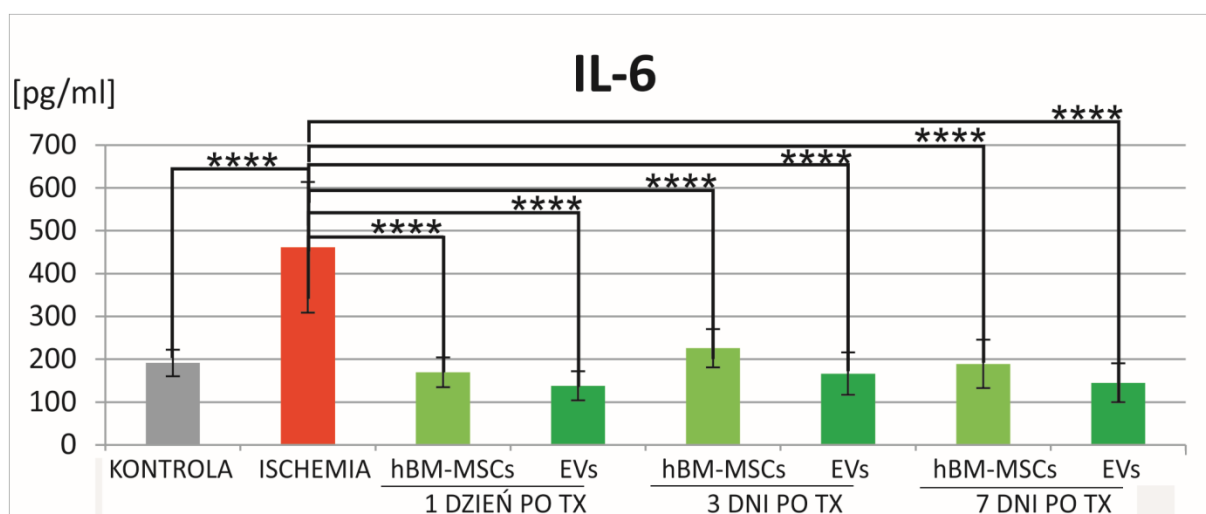
Podanie hBM-MSCs lub EVs prowadzi do obniżenia poziomu TGF- β 2. Mniejszą ilość czynnika TGF- β 2 obserwuje się po upływie 3 oraz 7 dni zarówno w przypadku iniekcji komórek jak i wyizolowanych z nich pęcherzyków (ryc.36).



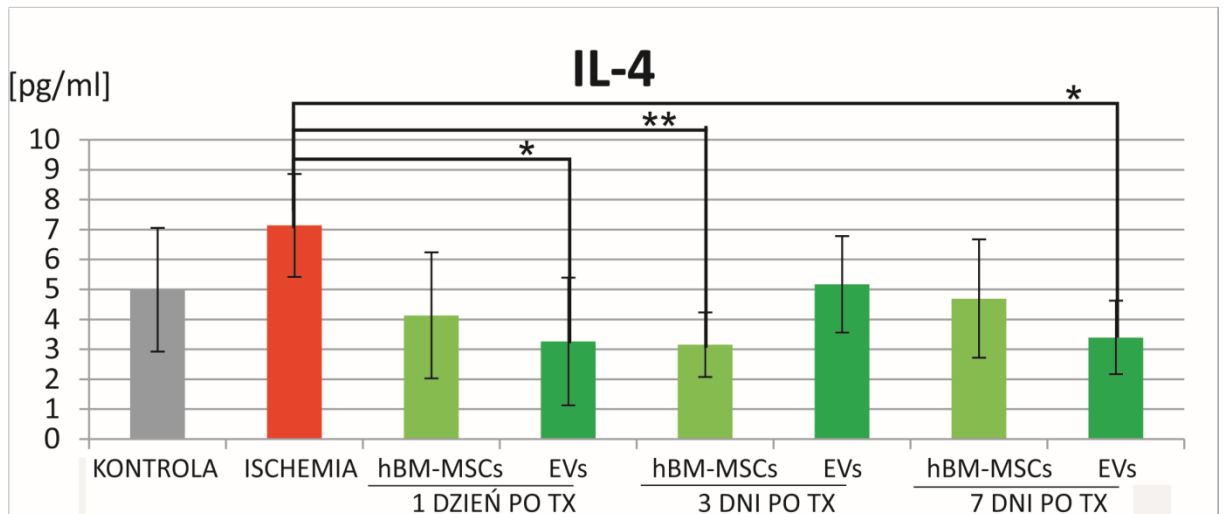
Ryc. 29. Wykres przedstawia poziom interleukiny 1 α w ipsilateralnej półkuli mózgu w poszczególnych grupach doświadczalnych szczurów (słupek szary – szczury zdrowe, słupek czerwony – zwierzęta 48 godzin po uszkodzeniu mózgu ouabainą, słupki jasnozielone i ciemnozielone – zwierzęta z uszkodzeniem mózgu po transplantacji hBM-MSCs lub EVs oceniane w sekwencji czasowej). Wyniki badań przedstawione, jako wartości średnie \pm SD, n=6, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$



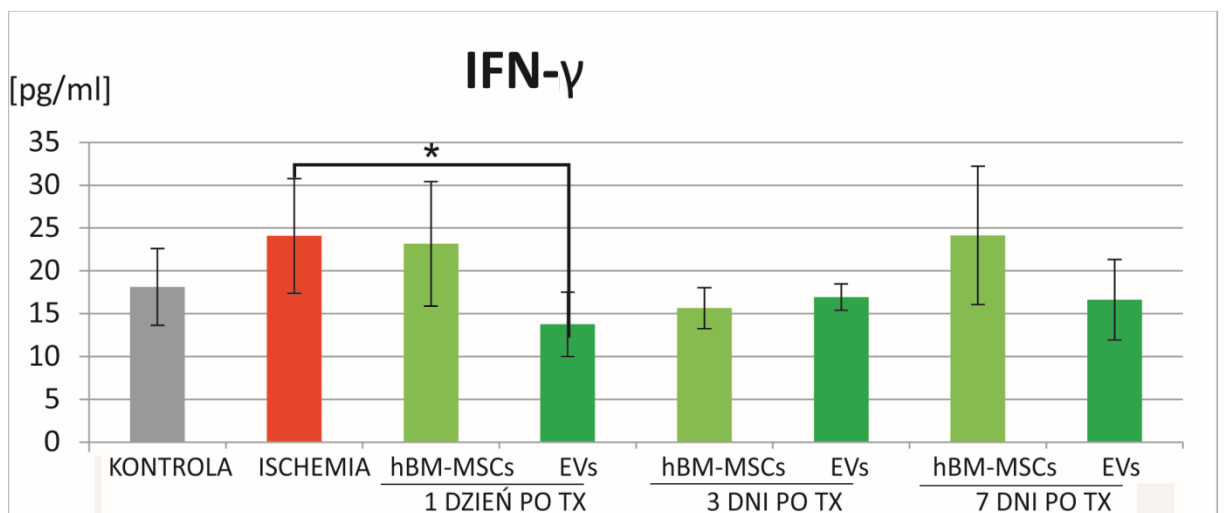
Ryc. 30. Wykres przedstawia poziom interleukiny 1 β w ipsilateralnej półkuli mózgu w poszczególnych grupach doświadczalnych szczurów (słupek szary – szczury zdrowe, słupek **czzerwony** – zwierzęta 48 godzin po uszkodzeniu mózgu ouabainą, słupki **jasnozielone** i **ciemnozielone** – zwierzęta z uszkodzeniem mózgu po transplantacji hBM-MSCs lub EVs oceniane w sekwencji czasowej). Wyniki badań przedstawione, jako wartości średnie \pm SD, n=6, * p<0.05; *** p<0.001; ****p<0.0001



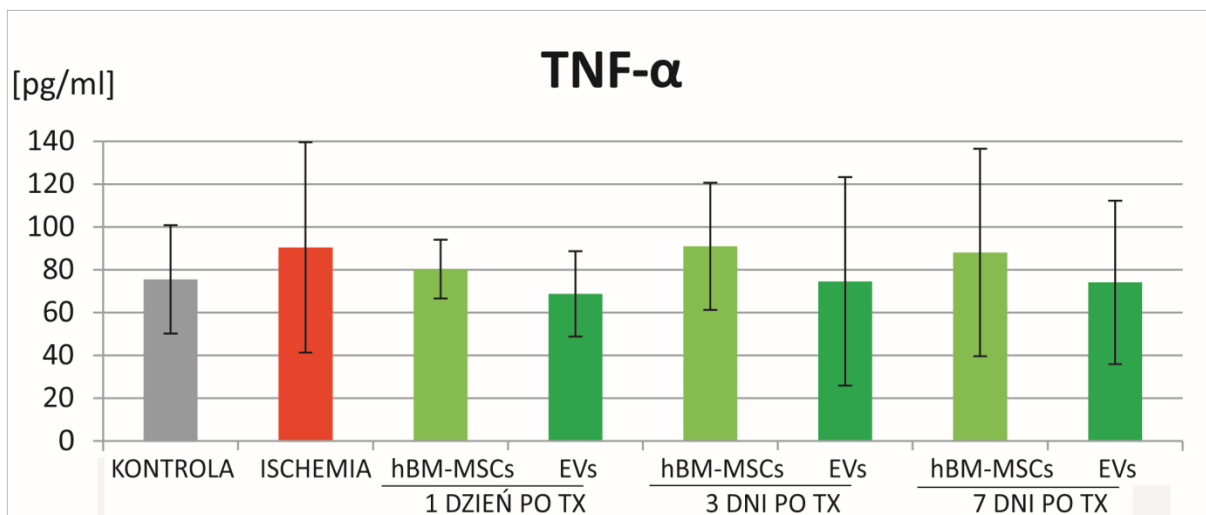
Ryc. 31. Wykres przedstawia poziom interleukiny 6 (IL-6) w ipsilateralnej półkuli mózgu w poszczególnych grupach doświadczalnych szczurów (słupek szary – szczury zdrowe, słupek **czzerwony** – zwierzęta 48 godzin po uszkodzeniu mózgu ouabainą, słupki **jasnozielone** i **ciemnozielone** – zwierzęta z uszkodzeniem mózgu po transplantacji hBM-MSCs lub EVs oceniane w sekwencji czasowej). Wyniki badań przedstawione, jako wartości średnie \pm SD n=6, **** p<0.0001



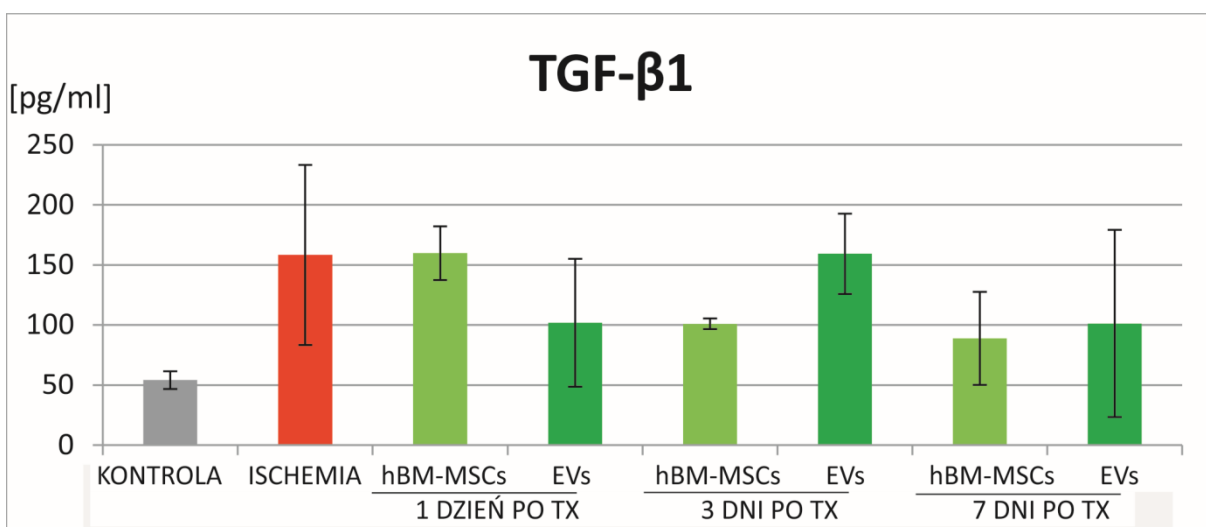
Ryc. 32. Wykres przedstawia poziom interleukiny 4 (IL-4) w ipsilateralnej półkuli mózgu w poszczególnych grupach doświadczalnych szczurów (słupek szary – szczury zdrowe, słupek czerwony – zwierzęta 48 godzin po uszkodzeniu mózgu ouabainą, słupki jasnozielone i ciemnozielone – zwierzęta z uszkodzeniem mózgu po transplantacji hBM-MSCs lub EVs oceniane w sekwencji czasowej). Wyniki badań przedstawione, jako wartości średnie \pm SD, n=6, * p<0.05; ** p<0.01



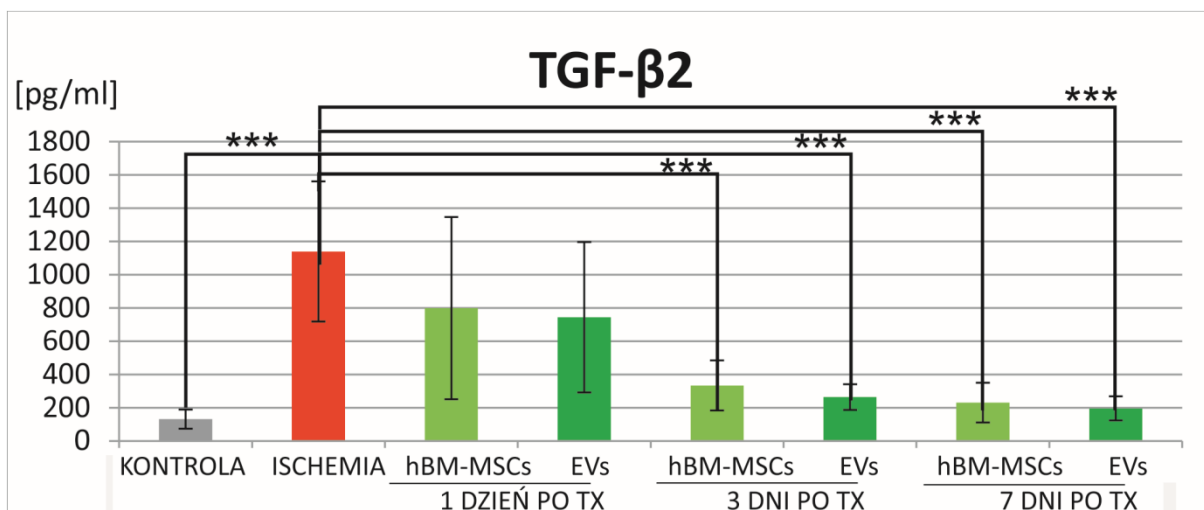
Ryc. 33. Wykres przedstawia poziom interferonu gamma (IFN- γ) w ipsilateralnej półkuli mózgu w poszczególnych grupach doświadczalnych szczurów (słupek szary – szczury zdrowe, słupek czerwony – zwierzęta 48 godzin po uszkodzeniu mózgu ouabainą, słupki jasnozielone i ciemnozielone – zwierzęta z uszkodzeniem mózgu po transplantacji hBM-MSCs lub EVs oceniane w sekwencji czasowej). Wyniki badań przedstawione, jako wartości średnie \pm SD, n=6, * p<0.05



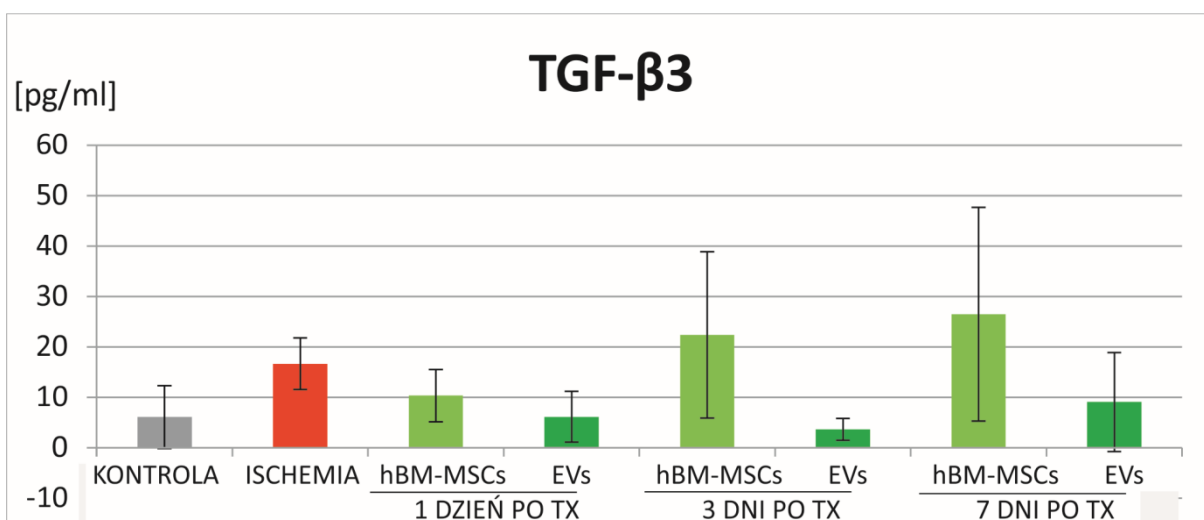
Ryc. 34. Wykres przedstawia poziom czynnika martwicy nowotworu α (TNF- α) w ipsilateralnej półkuli mózgu w poszczególnych grupach doświadczalnych szczurów (słupek szary – szczury zdrowe, słupek czerwony – zwierzęta 48 godzin po uszkodzeniu mózgu ouabainą, słupki jasnozielone i ciemnozielone – zwierzęta z uszkodzeniem mózgu po transplantacji hBM-MSCs lub EVs oceniane w sekwencji czasowej). Wyniki badań przedstawione, jako wartości średnie \pm SD, n=6



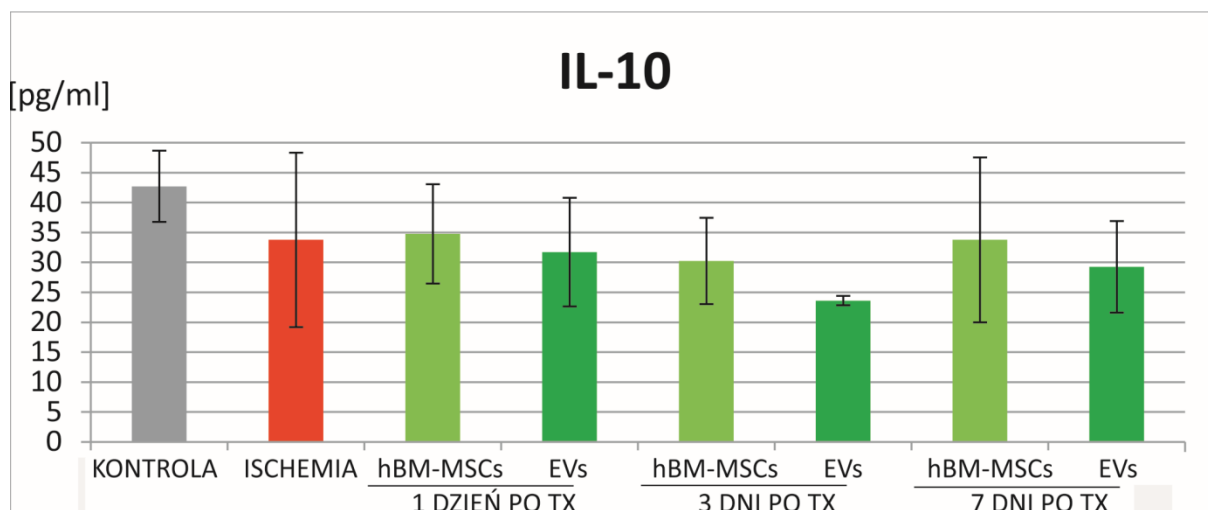
Ryc. 35. Wykres przedstawia poziom transformującego czynnika wzrostu $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) w ipsilateralnej półkuli mózgu w poszczególnych grupach doświadczalnych szczurów (słupek szary – szczury zdrowe, słupek czerwony – zwierzęta 48 godzin po uszkodzeniu mózgu ouabainą, słupki jasnozielone i ciemnozielone – zwierzęta z uszkodzeniem mózgu po transplantacji hBM-MSCs lub EVs oceniane w sekwencji czasowej). Wyniki badań przedstawione, jako wartości średnie \pm SD, n=6



Ryc. 36. Wykres przedstawia poziom transformującego czynniki wzrostu $\beta 2$ (TGF- $\beta 2$) w ipsilateralnej półkuli mózgu w poszczególnych grupach doświadczalnych szczurów (słupek szary – szczury zdrowe, słupek czerwony – zwierzęta 48 godzin po uszkodzeniu mózgu ouabainą, słupki jasnozielone i ciemnozielone – zwierzęta z uszkodzeniem mózgu po transplantacji hBM-MSCs lub EVs oceniane w sekwencji czasowej). Wyniki badań przedstawione, jako wartości średnie \pm SD, n=6, *** p<0.001

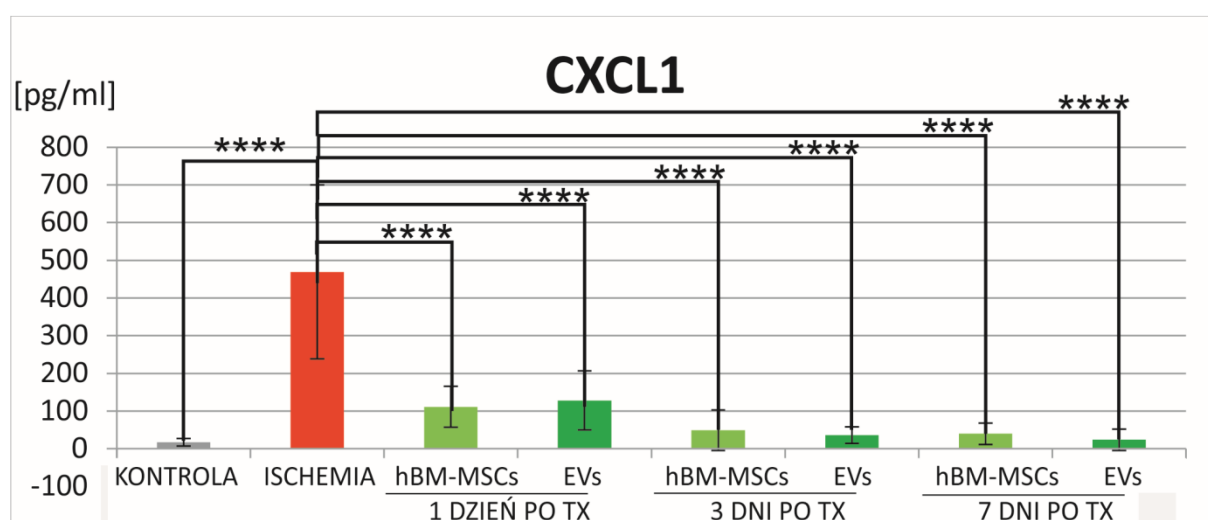


Ryc. 37. Wykres przedstawia poziom transformującego czynniki wzrostu $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$) w ipsilateralnej półkuli mózgu w poszczególnych grupach doświadczalnych szczurów (słupek szary – szczury zdrowe, słupek czerwony – zwierzęta 48 godzin po uszkodzeniu mózgu ouabainą, słupki jasnozielone i ciemnozielone – zwierzęta z uszkodzeniem mózgu po transplantacji hBM-MSCs lub EVs oceniane w sekwencji czasowej). Wyniki badań przedstawione, jako wartości średnie \pm SD, n=6

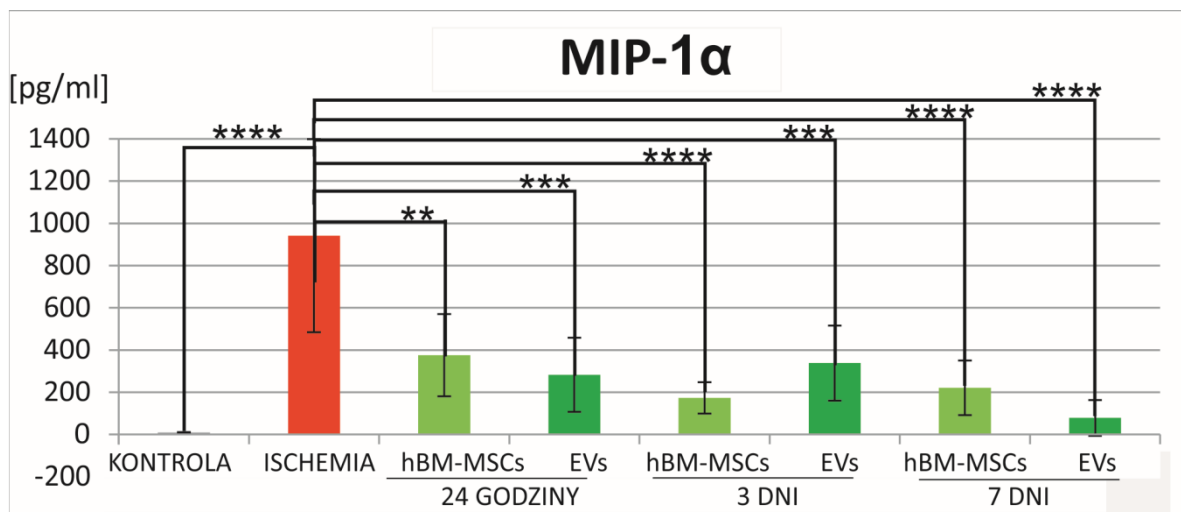


Ryc. 38. Wykres przedstawia poziom interleukiny 10 (IL-10) w ipsilateralnej półkuli mózgu w poszczególnych grupach doświadczalnych szczurów (słupek szary – szczury zdrowe, słupek czerwony – zwierzęta 48 godzin po uszkodzeniu mózgu ouabainą, słupki jasnozielone i ciemnozielone – zwierzęta z uszkodzeniem mózgu po transplantacji hBM-MSCs lub EVs oceniane w sekwencji czasowej). Wyniki badań przedstawione, jako wartości średnie \pm SD, n=6

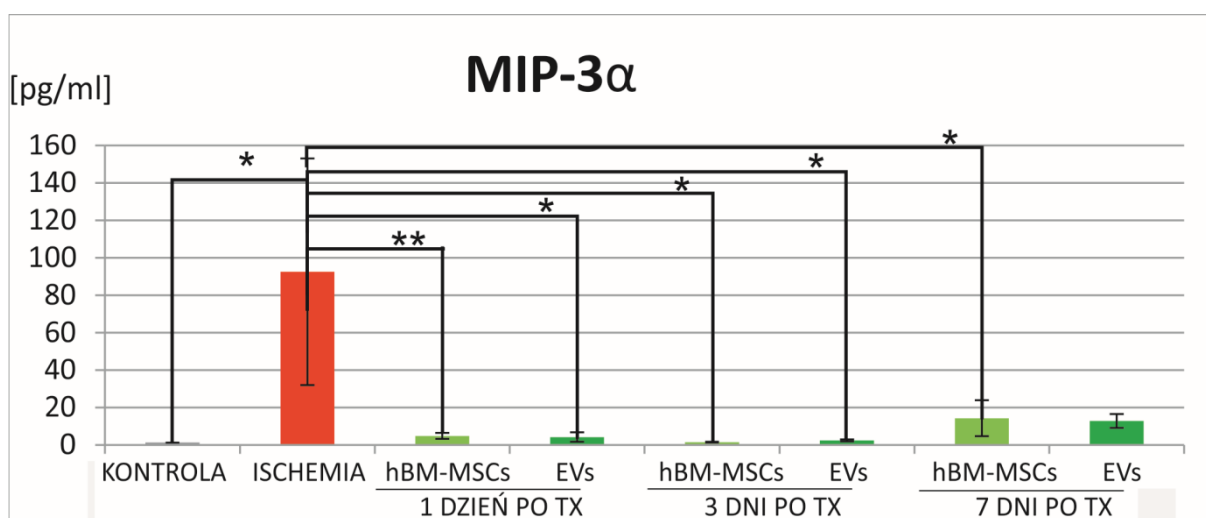
Analiza poziomu chemokiny w mózgu zwierząt eksperymentalnych wykazała obniżenie wszystkich badanych czynników po przeszczepie hBM-MSCs lub EVs. Różnice te były wysoce znamienne statystycznie we wszystkich punktach czasowych (ryc.39-42). Największy spadek obserwowano w przypadku CXCL1 ($p < 0.0001$). Przy podaniu komórek lub wyizolowanych z nich pęcherzyków poziom tej chemokiny podobnie jak MIP-3 α w niektórych punktach czasowych był zbliżony do wartości obserwowanej w mózgu zdrowych szczurów.



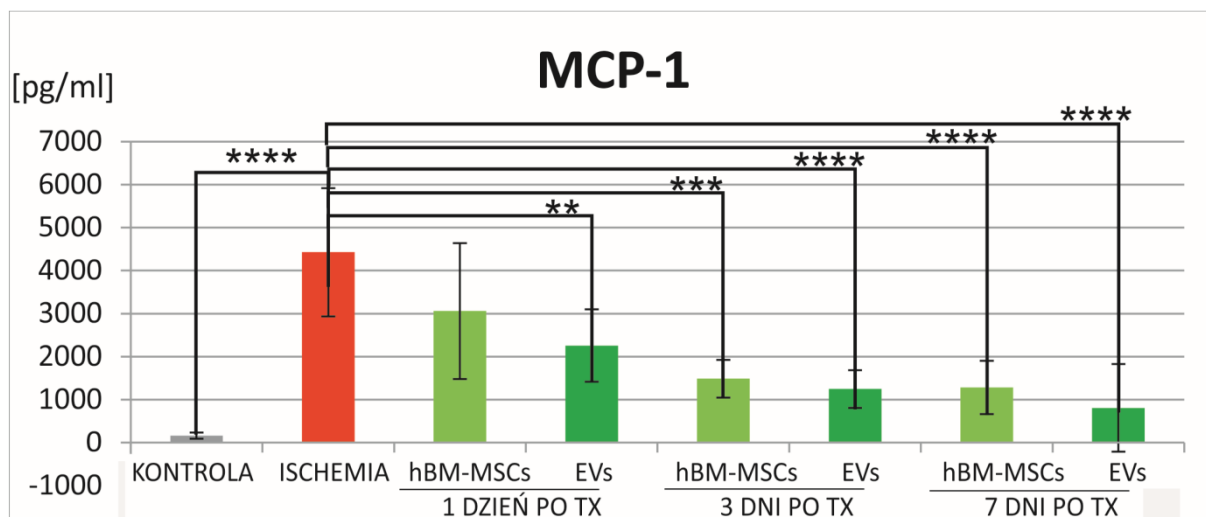
Ryc. 39. Wykres przedstawia poziom chemokiny CXC ligand 1 (CXCL1) w ipsilateralnej półkuli mózgu w poszczególnych grupach doświadczalnych szczurów (słupek szary – szczury zdrowe, słupek czerwony – zwierzęta 48 godzin po uszkodzeniu mózgu ouabainą, słupki jasnozielone i ciemnozielone – zwierzęta z uszkodzeniem mózgu po transplantacji hBM-MSCs lub EVs oceniane w sekwencji czasowej). Wyniki badań przedstawione, jako wartości średnie \pm SD, n=6, **** $p < 0.0001$



Ryc. 40. Wykres przedstawia poziom białka zapalnego makrofagalnego-1alpha (MIP-1 α) w ipsilateralnej półkuli mózgu w poszczególnych grupach doświadczalnych szczurów ((słupek szary – szczury zdrowe, słupek czerwony – zwierzęta 48 godzin po uszkodzeniu mózgu ouabainą, słupki jasnozielone i ciemnozielone – zwierzęta z uszkodzeniem mózgu po transplantacji hBM-MSCs lub EVs oceniane w sekwencji czasowej). Wyniki badań przedstawione, jako wartości średnie \pm SD, n=6, ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001



Ryc. 41. Wykres przedstawia poziom białka zapalnego makrofagalnego-3alpha (MIP-3 α) w ipsilateralnej półkuli mózgu w poszczególnych grupach doświadczalnych szczurów (słupek szary – szczury zdrowe, słupek czerwony – zwierzęta 48 godzin po uszkodzeniu mózgu ouabainą, słupki jasnozielone i ciemnozielone – zwierzęta z uszkodzeniem mózgu po transplantacji hBM-MSCs lub EVs oceniane w sekwencji czasowej). Wyniki badań przedstawione, jako wartości średnie \pm SD, n=6, *<0.05; ** p<0.01



Ryc. 42. Wykres przedstawia poziom białka chemotaktycznego dla monocytów (MCP-1) w ipsilateralnej półkuli mózgu w poszczególnych grupach doświadczalnych szczurów (słupki szary – szczury zdrowe, słupki czerwony – zwierzęta 48 godzin po uszkodzeniu mózgu ouabainą, słupki jasnozielone i ciemnozielone – zwierzęta z uszkodzeniem mózgu po transplantacji hBM-MSCs lub EVs oceniane w sekwencji czasowej). Wyniki badań przedstawione, jako wartości średnie \pm SD, n=6, ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001

Wyniki naszych badań *in vivo* wpisują się w dotychczasowe nieliczne doniesienia światowe. Pomimo prowadzonych eksperymentów z udziałem transplantacji zewnątrzkomórkowych pęcherzyków oraz opisywanych efektów ich działania, nikomu jak dotąd nie udało się wykazać ograniczenia zarówno odpowiedzi wrodzonej jak i adaptacyjnej w mózgu zwierząt, a także wydzielania mediatorów reakcji zapalnych powstających w wyniku ischemii. Wyniki naszych badań, wskazujące na immunomodulacyjny efekt EVs zostały opracowane i przesłane do publikacji, są aktualnie przedmiotem recenzji, a także zgłoszenia patentowego, które może nam pozwolić w przyszłości na opracowanie potencjalnego produktu do zastosowań klinicznych.

6. Dyskusja

Możliwość wspomagania odnowy nieodwracalnie uszkodzonych w wyniku udaru struktur tkanki nerwowej przy pomocy przeszczepów komórek macierzystych pojawiła się w końcu ubiegłego wieku (Eriksson i wsp., 1998), a pierwsze próby kliniczne przeprowadzono w kilka lat później (Kondziolka i wsp., 2000). Transplantacje komórek macierzystych okazały się bezpieczne, ale wyniki eksperymentów medycznych nie pozwoliły jednoznacznie określić działania podanych komórek. Progenitory neuralne przeszczepiane biorcom po niedokrwieniu OUN nie różnicowały się w dojrzałe funkcjonalne neurony, nie obserwowano wzmoczonej endogennej neurogenezy w mózgu biorcy.

Dyskusja o tym, czy neurogeneza ma miejsce w mózgu dorosłych ludzi powraca stale na łamach prasy naukowej, jest również kwestią rozważań podczas międzynarodowych konferencji i sympozjów (Kempermann i wsp., 2018). Zagadnienie to znalazło swój wyraz w wynikach dwóch prac opublikowanych ostatnio w renomowanych czasopismach, gdzie autorzy przedstawili sprzeczne na ten temat opinie. Badania grupy Alvarez-Buylla wykazały, że proces neurogenezy w ludzkim mózgu obniża się znacząco u dzieci, natomiast u dorosłych osób jest praktycznie niewykrywalny (Sorrells i wsp., 2018). Z kolei wyniki analizy przeprowadzonej przez Boldrini i wsp. doprowadziły autorów do diametralnie różnych konkluzji, wskazując na obecność procesu neurogenezy przez cały czas życia u ludzi (Boldrini i wsp., 2018).

Nagła śmierć komórek neuralnych w miejscu niedotlenienia po udarze i uwalnianie czynników związanych z uszkodzeniem tkanki jest wynikiem lokalnych reakcji immunologicznych w mózgu. Miejscowy „proces zapalny” (*ang. sterile inflammation*) wywołany zmianami w tkance powstałymi

na skutek ischemii zwiększa obszar uszkodzenia, stąd wydaje się, że zahamowanie niekorzystnych reakcji komórek immunologicznie czynnych może mieć istotny wpływ na ograniczenie zmian w tkance nerwowej.

Wyniki badań ostatnich lat dowiodły, że mezenchymalne komórki macierzyste zastosowane w terapiach uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego, w tym udaru niedokrwienego mózgu, mają działanie neuroprotektoryjne i immunomodulatoryjne (Acosta i wsp., 2015; Dulamea, 2015; Lee i wsp., 2015; Karlupia i wsp., 2014; Yoo i wsp., 2013). Pomimo pozytywnych efektów działania MSCs przeszczepionych w modelach ischemii mózgu (Bang i wsp., 2005; Bhasin i wsp., 2011; Savitz i wsp., 2011) niektórzy badacze wykazali zagrożenia w ich zastosowaniu, m.in. ryzyko odrzucenia przeszczepu po transplantacji allogenicznej (Eliopoulos i wsp., 2005), możliwość zablokowania mniejszych naczyń krwionośnych (Gleeson i wsp., 2015) czy też niebezpieczeństwo związane z transformacją nowotworową (Armesilla-Diaz i wsp., 2009). Najnowsze prace wielu autorów wykazały, że terapeutyczne właściwości MSCs są związane ich działaniem parakrynnym. Odkrycie zewnątrzkomórkowych pęcherzyków, za pośrednictwem których przenoszone są cytokiny, chemokiny czy czynniki neurotroficzne, budzi wielkie nadzieje w leczeniu uszkodzeń powstałych w wyniku udaru niedokrwienego mózgu i stanowi alternatywę dla wykorzystywanych w tym celu mezenchymalnych komórek macierzystych.

Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki pochodzące z MSCs nie wykazują ograniczeń związanych z ich odrzucaniem w przypadku przeszczepów międzygatunkowych czy niebezpieczeństwem indukowania procesu nowotworzenia, ponadto mają zdolność do przekraczania bariery krew-mózg (Chen i wsp., 2016), wykazują większą stabilność podczas przechowywania, a ze względu na ich małe rozmiary procedura transplantacji jest łatwiejsza niż w przypadku komórek. Do tej pory opisano właściwości EVs stosowanych w terapiach wielu chorób, w tym także ośrodkowego układu nerwowego, jednakże ich rola immunomodulatoryjna w leczeniu uszkodzeń powstałych w wyniku udaru niedokrwienego mózgu nie została do tej pory dokładnie określona.

Podczas moich badań śledziłam proces migracji i dystrybucji ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego i wyizolowanych z nich zewnątrzkomórkowych pęcherzyków, podanych dotętniczo szczurom po uszkodzeniu prążkowania ouabainą oraz analizowałam modulację komórkowej i humoralnej odpowiedzi immunologicznej biorcy po podaniu hBM-MSCs lub EVs. Przedmiotem badań były ludzkie mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego dorosłych dawców dostępne komercyjnie (Lonza) i zewnątrzkomórkowe pęcherzyki wyizolowane z nadsączy komórkowych metodą sekwencyjnego wirowania. Otrzymanie stabilnych, jednorodnych hodowli komórek i izolacja EVs według tej samej, powtarzalnej procedury umożliwiła stworzenie stabilnych układów doświadczalnych. Eksperymenty *in vivo* prowadzone były z wykorzystaniem opracowanego w naszym zespole modelu cytotoksycznego uszkodzenia mózgu za pomocą ouabainy (Janowski i wsp., 2008), imitującego strukturalne i funkcjonalne uszkodzenie struktur głębokich mózgu mające miejsce w sytuacjach klinicznych. W moich doświadczeniach hBM-MSCs lub EVs podawane były do prawej tętnicy szyjnej wspólnej, umożliwiającej przepływ komórek lub zewnątrzkomórkowych pęcherzyków bezpośrednio do uszkodzonej półkuli mózgu zwierząt, zgodnie z protokołem opracowanym wcześniej przez naszą grupę (Janowski i wsp., 2013).

6.1. Analiza EVs wyizolowanych z MSCs

Metoda sekwencyjnego wirowania, obejmująca ultrawierowanie nadsączy komórkowych, jest najczęściej stosowanym sposobem izolacji EVs z komórek, wykorzystywanym aż przez 81% badaczy (Gardiner i wsp., 2016). Ta metoda pozwala na pozyskanie różnych subpopulacji EVs, zależnie od prędkości wirowania, ponadto nie wymaga dużych nakładów finansowych i jest stosunkowo łatwa do przeprowadzenia. W moich badaniach zoptymalizowałam metodę sekwencyjnego wirowania nadsączy pochodzących z hodowli hBM-MSCs. Otrzymana przeze mnie populacja zewnątrzkomórkowych pęcherzyków zawierała mniejsze egzosomy i większe mikropęcherzyki. Technika ta pozwoliła na otrzymanie czystych, stabilnych i powtarzalnych ilościowo i jakościowo populacji EVs, które były wykorzystywane w dalszych badaniach. Metoda sekwencyjnego wirowania jest stosunkowo prosta, ma jednak wiele ograniczeń, takich jak długi czas izolacji, problemy z odseparowaniem zewnątrzkomórkowych pęcherzyków od białek i fragmentów błon, czy też trudności w stworzeniu wielkoskalowej produkcji EVs niezbędnej w badaniach klinicznych. W najnowszych pracach coraz więcej badaczy podejmuje próby opracowania innych metod izolacji zewnątrzkomórkowych pęcherzyków, m.in. takich, jak wirowanie w gradiencie gęstości, filtrowanie, chromatografia immunopowinowactwa, chromatografia z wykluczeniem wielkości (SEC), precypitacja z polimerami czy wiązanie z kulkami magnetycznymi (Gardiner i wsp., 2016; Szatanek i wsp., 2015), które mogą być w przyszłości powszechnie stosowane do pozyskiwania EVs z nadsączy komórkowych. W naszych dalszych badaniach planujemy zastosować inne metody otrzymywania EVs, szczególnie iż po tegorocznym zgłoszeniu patentowym będziemy starali się wykorzystać nasze odkrycie w zastosowaniach klinicznych.

W celu wizualizacji wewnątrzkomórkowych pęcherzyków w komórkach stosowane są obecnie różne metody ich znakowania i obrazowania. Busato i współpracownicy jako pierwsi zarejestrowali pobieranie bardzo małych superparamagnetycznych nanocząstek żelaza (USPIO) przez mezenchymalne komórki macierzyste izolowane z tkanki tłuszczowej i ich akumulację w endosomach wewnątrz komórki za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) (Busato i wsp., 2016). W moich badaniach analizowałam proces wnikania superparamagnetycznych nanocząstek żelaza (SPIO) do wewnątrzkomórkowych pęcherzyków podczas znakowania hBM-MSCs, przy użyciu TEM. Zastosowanie SPIO skoniugowanych z barwnikiem fluorescencyjnym-rodaminą (Molday ION)

dotatkowo umożliwiło detekcję pęcherzyków endosomalnych z wykorzystaniem superrozdzielczego systemu mikroskopowego SIM.

Zewnątrzkomórkowe pęcherzyki wyizolowane z komórek oceniane są obecnie za pomocą różnych metod. Busato i współpracownicy zarejestrowali z użyciem transmisyjnej mikroskopii elektronowej gromadzenie się USPIO w postaci skupisk w EVs (Busato i wsp., 2016). Obecność nanocząstek żelaza w EVs wyizolowanych ze znakowanych SPIO komórek jest często potwierdzana także za pomocą rezonansu magnetycznego (Busato i wsp., 2016; Hu i wsp., 2014). W moich doświadczeniach udało się zobrazować EVs wyznakowane nanocząstkami żelaza za pomocą rezonansu magnetycznego, ponadto w swoich badaniach dodatkowo wykazałam znaczącą zmianę czasu relaksacji podczas obrazowania T2-zależnego pomiędzy EVs niewyznakowanymi i wyznakowanymi nanocząstkami żelaza. Zastosowane w moich badaniach nanocząstki SPIO związane z rodaminą były jednolicie rozmieszczone w EVs. Tak znakowane EVs były oceniane *in vitro* w badaniach zdolności ich migracji do komórek podczas współhodowli z hBM-MSCs. W ostatnich latach również inne grupy badaczy wykorzystywały metodę znakowania nanocząstkami żelaza do oceny migracji EVs do wnętrza komórek (Busato i wsp., 2016; Jung i wsp., 2018).

W badaniach eksperymentalnych do identyfikacji EVs stosowane są także błonowe barwniki fluorescencyjne, między innymi PKH26, PKH67 (Fitzner i wsp., 2011), rodamina B, Dil (Tian i wsp. 2013) oraz DiD (Tian i wsp., 2010). Często używanymi znacznikami są również związki chemiczne przenikające do cytoplazmy i w wyniku estryfikacji świecące fluorescencyjnie, takie jak CFSE i CFDA (Temchura i wsp., 2008). Zastosowany przez nas do obrazowania zewnątrzkomórkowych pęcherzyków Molday ION umożliwia ocenę znakowanych EVs wieloma metodami, w tym: LSM, TEM czy MRI, co daje duże nadzieje na wykorzystanie tego znacznika w badaniach przedklinicznych i klinicznych. Jednakże w badaniach *in vivo* bardzo trudno jest odróżnić EVs wyznakowane SPIO od wolnych nanocząstek żelaza spontanicznie z nich uwalnianych, z uwagi na mikroskopijne rozmiary EVs i SPIO. Z tego powodu w naszych doświadczeniach *in vivo* zdecydowałam się na wykorzystanie do znakowania EVs lipofilnego markera błonowego PKH26. Analiza immunohistochemiczna przeprowadzona w skrawkach mózgu zwierząt 24 godziny po dotętnicznej transplantacji zewnątrzkomórkowych pęcherzyków znakowanych PKH26 ujawniła obecność skupisk EVs w prawej półkuli mózgu szczura.

W celu określenia liczby i wielkości EVs zastosowałam analizę NTA, która jest metodą umożliwiającą określenie wielkości oraz liczebności struktur na podstawie pomiaru ich ruchów Brauna i jest najczęściej wykorzystywaną metodą oceny pojedynczych cząstek do charakterystyki EVs, stosowaną przez 80% badaczy (Gardiner i wsp., 2016). Franquesa i wsp., opracowując metody izolacji i kwantyfikacji zewnątrzkomórkowych pęcherzyków, wykazali, że średnia wielkość EVs wynosiła 115 nm, a większość z nich mieściła się w przedziale od 90 do 150 nm. Ponadto określili liczebność populacji EVs, która wynosiła 2.5×10^8 /ml EVs pochodząca z 1×10^6 AD-MSCs (Franquesa i wsp., 2014). Analiza przeprowadzona z użyciem NTA wykazała, że większość EVs (ponad 80%) miała rozmiar od 86-218 nm, a ich liczba wynosiła ok. 1.2×10^9 /ml EVs z nadsączy hodowli 5×10^6 hBM-MSCs.

Obecność markerów charakteryzujących EVs była oceniana przy pomocy superrozdzielczej cytometrii przepływowej z zastosowaniem aparatury ApoGee A-50 Micro wykorzystywanej do analizy małych struktur, takich jak zewnątrzkomórkowe pęcherzyki. Markery mezenchymalnych komórek macierzystych znajdujące się na większych mikropęcherzykach, które odpączkowały z błony komórkowej, w moich badaniach widoczne były w 10-20% populacji EVs, co korelowało z wynikami otrzymanymi za pomocą NTA. Z kolei tetraspaniny, obecne głównie na egzosomach mniejszych niż 100 nm powstałych z ciałek wielopęcherzykowych, które ze względu na wielkość kulek kalibracyjnych (110 nm) i czułość sprzętu prawdopodobnie w większości nie mogły być mierzone w

tym systemie, stąd ekspresja tetraspanin w moich doświadczeniach, wynosząca kilka procent dotyczyła oceny tylko fragmentu populacji EVs, których wielkość wynosiła ponad 110 nm.

Zastosowanie superrozdzielczej cytometrii przepływowej umożliwiło nam pomiar ilości EVs wyznakowanych markerami fluorescencyjnymi, w tym przypadku PKH26. W moich badaniach, po barwieniu *in vitro*, 58.9% EVs było wyznakowanych PKH26, z tym że 9.7% pozytywnej reakcji stanowiło świecenie pochodzącego od barwnika lipofilnego markera PKH26 i białka FBS. Reasumując, po uwzględnieniu niespecyficznego sygnału, ok. 50% EVs wykazała obecność lipofilnego markera PKH26, co pozwoliło na późniejsze ich zobrazowanie w doświadczeniach *in vivo*.

Czystość populacji EVs może być oceniana różnymi metodami, jedną z technik jest analiza białek obecnych na błonach komórkowych, a nie występujących na zewnątrzkomórkowych pęcherzykach. Kanuma i współpracownicy zastosowali kalneksynę - białko występujące na siateczce śródplazmatycznej w celu potwierdzenia poprawności izolacji zewnątrzkomórkowych pęcherzyków. Badacze nie stwierdzili obecności kalneksyny na EVs, natomiast jej ekspresja pojawiała się na błonach pochodzących z komórek (Kanuma i wsp., 2017). W moich doświadczeniach wykorzystując technikę Western Blot nie zaobserwowałam obecności kalneksyny na EVs wyizolowanych z hBM-MSCs, co potwierdza, że były one czystą populacją, pozbawioną zanieczyszczeń pęcherzykami apoptocytocnymi lub błonami komórkowymi.

Opracowana przez nas metoda izolacji zewnątrzkomórkowych pęcherzyków z ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego umożliwiła otrzymanie czystej populacji EVs, która może być zastosowana do badań ich funkcji działania w eksperymentach zarówno *in vitro* jak i *in vivo*.

6.2. Ocena migracji i osiedlania się MSCs i EVs po przeszczepie dotętniczym

Systemowa droga transplantacji jest mało inwazyjna w stosunku do podania domózgowego i staje się coraz powszechniej stosowanym sposobem przeszczepu komórek. Z dotychczasowych badań wynika, iż w przypadku podania dożylnego komórki gromadzą się w dużej liczbie w płucach, wątrobie czy śledzionie (Lappalainen i wsp., 2008), natomiast MSCs podane dotętniczo mogą migrować do uszkodzonego mózgu (Mitkari i wsp., 2013). Zastosowana w moich badaniach metoda transplantacji drogą dotętniczą wydaje się stanowić zarówno bezpieczny jak i efektywny sposób podania komórek lub zewnątrzkomórkowych pęcherzyków do uszkodzonej podczas epizodu niedokrwienia półkuli w przypadku drożności naczyń mózgowych.

We wcześniejszych projektach naszego Zespołu badano dystrybucję przeszczepionych progenitorów komórek glejowych (GRPs) wyznakowanych Molday ION przeszczepionych dotętniczo. Analiza przeprowadzona za pomocą rezonansu magnetycznego ujawniła komórki dawcy w mózgu szczura bezpośrednio po podaniu (Janowski i wsp., 2013). W moich badaniach hBM-MSCs znakowane Molday ION podane do tętnicy szyjnej wspólnej migrowały do prawej półkuli mózgu szczura i gromadziły się w okolicach uszkodzenia. Porównując zarejestrowane w MRI, w różnym czasie od transplantacji, obrazy mózgu biorców okazało się, że po 24 godzinach od przeszczepu liczba MSCs była niższa w porównaniu z obrazem tuż po przeszczepie. Po 3 dniach widoczny był dalszy spadek liczby komórek dawcy w mózgu szczura, a po 7 dniach obserwowano już tylko pojedyncze MSCs u niektórych zwierząt. Analiza podanych dotętniczo komórek wyznakowanych nanocząstkami żelaza w mózgu zwierząt za pomocą rezonansu magnetycznego została przeprowadzona także przez innych badaczy. Namestnikova i współpracownicy wykazali obecność przeszczepionych dotętniczo MSCs wyznakowanych SPIO w obszarze zwojów podstawy i korze mózgowej prawej półkuli mózgu szczura bezpośrednio po transplantacji (Namestnikova i wsp., 2017). Walczak i wsp. obserwowali MSCs wyznakowane SPIO w uszkodzonej półkuli mózgu szczura w czasie 2-24 godziny po podaniu

dotętnicznym (Walczak i wsp., 2008). Badania grupy Kamiya wykazali obniżenie liczby przeszczepionych dotętniczo komórek jednojądrzastych szpiku kostnego w mózgu po 7 dniach od transplantacji (Kamiya i wsp., 2013), co jest zgodne z wynikami otrzymanymi w naszych doświadczeniach. Co ciekawe, Lu i współpracownicy zaobserwowali, że liczba komórek znakowanych nanocząstkami żelaza osiedlających się w mózgu biorców przeszczepu koreluje z wielkością uszkodzenia w dniu przeszczepu (Lu i wsp., 2013).

W celu weryfikacji obecności przeszczepionych żywych komórek w mózgu zwierząt, oprócz analizy w MRI, wielu badaczy stosuje barwienia immunohistochemiczne. Namestnikova i wsp. zobrazowali kolokalizację nanocząstek żelaza zawierających fluorescencyjne polimery magnetyczne MC03F i markera błonowego PKH26, świadcząca o obecności żywych komórek w mózgu szczura po transplantacji (Namestnikova i wsp., 2017). Walczak i wsp. zbadali żywotność komórek w badaniach immunohistochemicznych z użyciem anty-BrdU, będącym markerem komórek proliferujących, potwierdzając obecność przeszczepionych dotętniczo żywych, dzielących się MSCs w uszkodzonej półkuli mózgu szczura (Walczak i wsp., 2008). Natomiast Byun i wsp. zastosowali przeciwciała anty-mitochondrialne, potwierdzając w ten sposób występowanie żywych komórek z nieuszkodzonymi mitochondriami w mózgu szczurów po ich dotętniczej transplantacji (Byun i wsp., 2013). W przeprowadzonych przeze mnie badaniach znakowane hBM-MSCs wykazywały ko-ekspresję rodaminy B, barwnika, będącego częścią składową Molday ION i markera mezenchymalnych komórek macierzystych – CD44 lub ludzkich komórek – STEM121 po upływie 1, 3 i 7 dni od transplantacji. W siódmym dniu po przeszczepie nie wszystkie komórki wyznakowane Molday ION były wybarwione CD44 i STEM121, co świadczy o stopniowym obumieraniu komórek w tym punkcie czasowym.

Badania prowadzone przez nasz zespół (Andrzejewska i wsp, nieopublikowane), jak również doświadczenia innych badaczy dowodzą, iż MSCs po dotętniczej transplantacji pozostają w naczyniach krwionośnych mózgu szczura i nie przedostają się do parenchymy (Mitkari i wsp., 2013). Transplantacja zewnątrzkomórkowych pęcherzyków, które mają zdolność do przekraczania bariery krew-mózg, przenikania do tkanki nerwowej i działania bezpośrednio w miejscu uszkodzenia, wydaje się być alternatywą dla przeszczepu komórek. W porównaniu do badań określających lokalizację mezenchymalnych komórek macierzystych po przeszczepie dotętniczym, niewielka liczba prac definiuje miejsce, do którego migrują zewnątrzkomórkowe pęcherzyki po ich systemowym podaniu. Ze względu na bardzo małe rozmiary, jak również ograniczone metody znakowania i wizualizacji, detekcja EVs w mózgu zwierząt jest niezwykle trudna, dlatego większość badaczy określa jedynie efekt przez nie wywołany. Nieliczne badania wykonane w ostatnich latach wykazały, że przeszczepione EVs wyznakowane barwnikami fluorescencyjnymi są obecne w mózgu zwierząt. Chen i współpracownicy zwizualizowali podane dożylnie egzosomy wybarwione lipofilnym markerem błonowym Dil w mózgu szczurów po ischemii (Chen i wsp., 2016). Podobnie, Xin i wsp. zarejestrowali transfer egzosomów wzbogaconych o miRNA-133b z białkiem zielonej fluorescencji (GFP) z MSCs na neurony i astrocyty w mózgu szczurów (Xin i wsp., 2013b). W moich badaniach udało mi się zobrazować przeszczepione dotętniczo zewnątrzkomórkowe pęcherzyki wyznakowane PKH26, wykonując analizę immunohistochemiczną skrawków mózgu biorców. Skupiska EVs były widoczne w prawej półkuli mózgu szczura 24 godziny po ich dotętniczej transplantacji.

Stosowane są również inne metody znakowania do oceny przeszczepionych EVs w mózgu zwierząt. Lapchak i współpracownicy użyli lipofilnego znacznika błonowego DiD w celu detekcji podanych dożylnie i dotętniczo zewnątrzkomórkowych pęcherzyków w obszarze uszkodzenia mózgu królików metodami bioluminescencji (Lapchak i wsp., 2018). Z kolei Hwang i wsp., do określenia umiejscowienia przeszczepionych dożylnie egzosomów wyznakowanych ^{99m}Tc -HMPAO, używali tomografii emisyjnej pojedynczych fotonów (SPECT) (Hwang i wsp., 2015). Jednak zarówno

bioluminescencja, jak i SPECT nie pozwalają dokładnie określić lokalizacji podanych EVs w obrębie danego organu, tak jak ma to miejsce w przypadku zastosowania metod fluorescencyjnych. Przeprowadzone zostały także pierwsze próby eksperymentalne wizualizacji EVs wyznakowanych nanocząstkami żelaza (Busato i wsp., 2016), jednakże trudności w interpretacji wyników przy zastosowaniu SPIO w celu wizualizacji EVs przeszczepionych dotętniczo w mózgu wymagają dalszych szczegółowych badań.

Nasze wyniki wykazały, iż znakowanie zewnątrzkomórkowych pęcherzyków PKH26 lub Molday ION nie ogranicza migracji EVs w badaniach *in vitro* i *in vivo* oraz umożliwia ich wizualizację w komórkach bądź tkankach gospodarza po transplantacji.

6.3. Analiza komórek odpowiedzi immunologicznej w mózgu szczura po uszkodzeniu prążkowiec i transplantacji hBM-MSCs lub EVs

Liczne badania wykazały, że uszkodzenie mózgu spowodowane ischemią prowadzi do aktywacji reakcji zapalnych, w tym do pobudzenia astrocytów, komórek mikrogleju oraz napływu leukocytów: monocytów, neutrofilów, limfocytów T i B z krwi obwodowej do uszkodzonej tkanki nerwowej (Ahmad i wsp., 2014; Iadecola i Anrather, 2011). W moich badaniach w wyniku cytotoksycznego uszkodzenia mózgu wywołanego podaniem ouabainy dochodziło do aktywacji astrocytów i komórek mikrogleju oraz infiltracji leukocytów do uszkodzonego prążkowiec. Dokładniejsza analiza udowodniła, że spośród subpopulacji limfocytów T do uszkodzonej tkanki nerwowej przenikają głównie limfocyty T CD8, zaś liczba limfocytów T CD4 nie ulega znaczącej zmianie. W wyniku ischemii prawdopodobnie dochodzi do zmian w obrębie populacji Th2, Th1 i Th17. Niestety z powodu braku specyficznych przeciwciał identyfikujących te fenotypy limfocytów, dostępnych dla szczura trudno nam potwierdzić te supozycje. W naszym modelu niedokrwienia, po podaniu ouabainy, nie obserwowaliśmy zwiększonego napływu neutrofilów do tkanki nerwowej. Jest to przypuszczalnie związane z faktem, iż do najsilniejszej infiltracji neutrofilów u szczurów dochodzi po 12 godzinach a ich wysoki poziom utrzymuje się w tkance nerwowej do 48 godzin od uszkodzenia mózgu (Ahmad i wsp., 2014), stąd nasza ocena przeprowadzana po 48 godzinach od zabiegu mogła nie zarejestrować zwiększonej liczby neutrofilów w tkance.

Po przeszczepie hBM-MSCs obserwowaliśmy zmniejszenie liczby aktywowanych astrocytów po 24 godzinach od transplantacji. Badania licznych grup prowadzone *in vitro* dowiodły, że wpływ MSCs na astrocyty może wiązać się nie tylko z blokowaniem ich działania, ale również ze zmianą fenotypu astrocytów z prozapalnego na przeciwzapalny. Polaryzacja astrocytów prowadzi do wychwytu przez nie glutamianu i produkcji czynników neurotroficznych, przez co mogą one działać neuroprotekcynie na uszkodzoną tkankę nerwową (Amantea i wsp., 2015).

Podobnie jak w przypadku działań MSCs na astrocyty wiele prac opisuje ich immunomodulacyjne efekty w stosunku do komórek mikrogleju, związane z zahamowaniem aktywacji i zmiany fenotypu z prozapalnego na przeciwzapalny (François i wsp., 2012; Maggini i wsp., 2010). W przeprowadzonych przeze mnie badaniach po przeszczepach zarówno hBM-MSCs jak i EVs obserwowany był spadek liczby komórek mikrogleju, w stosunku do sytuacji obserwowanej po niedokrwieniu. Ruppert i wsp. opisali pozytywne działanie EVs pochodzących z MSCs jeśli chodzi o obniżenie liczby komórek mikrogleju o fenotypie prozapalnym w uszkodzeniu rdzenia kręgowego (Ruppert i wsp., 2018). Udział przeszczepów EVs w ograniczaniu reakcji komórek mikrogleju w modelu niedokrwienia mózgu nie został jak dotąd zbadany.

W przypadku oceny reakcji leukocytów na uszkodzenie tkanki po ischemii, wielu badaczy wykazało, że przeszczep MSCs powoduje zahamowanie infiltracji leukocytów (Nauta i Fibbe, 2007, review). W moich badaniach transplantacja zarówno hBM-MSCs, jak i EVs powodowała obniżenie

ogólnej liczby leukocytów napływających do uszkodzonej tkanki nerwowej mózgu. Przeprowadzona przez Doeppnera i współpracowników analiza komórkowej odpowiedzi immunologicznej po transplantacji EVs w modelu ischemii mózgu u myszy nie wykazała zmian w liczbie leukocytów w mózgu w rejonie uszkodzenia (Doeppner i wsp., 2015). Różnice w stosunku do otrzymanych przez nas wyników mogą być spowodowane wykorzystaniem innej drogi iniekcji (Doeppner i wsp. podawali EVs dożylnie), zastosowania różnych dawek EVs czy przeszczepiania EVs w różnym czasie od wystąpienia uszkodzenia mózgu.

Wśród leukocytów napływających do uszkodzonej w wyniku ischemii tkanki istotną rolę odgrywają neutrofile. Gromadząc się w okolicy niedokrwienia, uwalniają cytokiny pro-zapalne, wolne rodniki tlenowe i enzymy proteolityczne, powodując dodatkowe zniszczenie tkanki nerwowej szczególnie w strefie półcienia. Badania licznych autorów dowiodły korzystnego działania przeszczepu hBM-MSCs do uszkodzonego w wyniku ischemii mózgu. Obserwowano zmniejszenie infiltracji neutrofilii do tkanki nerwowej i zahamowanie ich właściwości prozapalnych związanych z ograniczeniem wydzielania reaktywnych form tlenu i α -defensyny (Raffaghello i wsp., 2008; Quinn i wsp., 2008). W moich doświadczeniach brak było istotnych statystycznie różnic w liczbie neutrofilii po podaniu hBM-MSCs lub EVs szczurom z uszkodzonym prądkowiem. Podobnie, Doeppner i wsp. nie obserwowali znaczących zmian w infiltracji neutrofilii po ischemii i transplantacji EVs (Doeppner i wsp., 2015).

W populacji komórek immunologicznie czynnych, napływających z łożyska naczyniowego do uszkodzonej tkanki, limfocyty wydają się być bardzo istotne w późniejszej fazie odpowiedzi „zapalnej” po ischemii. Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały wzrost liczby limfocytów T w mózgu zwierząt 3 dni po przeszczepie EVs, w stosunku do liczby limfocytów T obecnych po niedokrwieniu. Wzrost ten może być związany z różnym udziałem poszczególnych subpopulacji w obrębie limfocytów T. W moich badaniach nie obserwowalam istotnie znaczących zmian w liczbie limfocytów T CD4⁺ ocenianej w mózgu szczurów po ischemii i po podaniu hBM-MSCs lub EVs. Podobnie, Doeppner i wsp. nie wykazali zmian liczby limfocytów T CD4⁺ po ischemii mózgu i transplantacji zewnątrzkomórkowych pęcherzyków (Doeppner i wsp., 2015). Z prac innych autorów wynika, że hBM-MSCs mają właściwości immunomodulacyjne, a ich działanie nie wynika z ograniczania liczby całej subpopulacji limfocytów T CD4⁺, ale aktywacji przekształcania limfocytów o fenotypie prozapalnym Th1 w komórki o fenotypie przeciwapalnym Th2, a także hamowania różnicowania limfocytów Th17 i indukcji powstawania limfocytów T regulatorowych (Bai i wsp., 2009; Batten i wsp., 2006; Ghannam i wsp., 2010). Być może uzyskane przez nas wyniki sugerują taki właśnie efekt działania przeszczepianych komórek lub izolowanych z nich zewnątrzkomórkowych pęcherzyków.

W dostępnych w literaturze naukowej pracach autorzy opisują hamujący wpływ MSCs na limfocyty T CD8⁺ (Rasmusson i wsp., 2003; van den Akker i wsp., 2013). W przeprowadzonych przeze mnie doświadczeniach, po przeszczepie hBM-MSCs lub EVs widoczne było zmniejszenie liczby limfocytów T CD8⁺, co wydaje się potwierdzać hamujące działanie mezenchymalnych komórek macierzystych i zewnątrzkomórkowych pęcherzyków na te komórki. Mocarizadeh i wsp. wykazali zmniejszenie aktywacji limfocytów T CD8⁺ w obecności EVs *in vitro* (Mocarizadeh i wsp., 2012), jednak immunosupresyjny efekt zewnątrzkomórkowych pęcherzyków na limfocyty T CD8⁺ w modelu ischemii mózgu nie został do tej pory opisany.

Z powyższych moich badań wynika, że przeszczepiane dotętniczo zewnątrzkomórkowe pęcherzyki mają zdolność do immunomodulacyjnego działania na komórki mózgu gospodarza porównywalną z efektem komórek mezenchymalnych, z których zostały wyizolowane.

6.4. Analiza mediatorów reakcji zapalnych w mózgu szczura po uszkodzeniu prądkowia i przeszczepie hBM-MSCs lub EVs

Uszkodzenie mózgu spowodowane udarem niedokrwiennym indukuje wydzielanie cytokin i chemokin pełniących istotną rolę w reakcjach na ischemię. Badania licznych grup wykazały, że interleukina 1 produkowana jest już po kilku godzinach, a jej głównym zadaniem jest stymulacja wydzielania cytokin prozapalnych, chemokin i cząsteczek związanych z adhezją komórek, przyczyniając się w ten sposób do rozszerzenia bariery krew-mózg (Sobowale i wsp., 2016; Yang i wsp., 2007). Prace wielu autorów opisują obniżenie poziomu IL-1 po transplantacji mezenchymalnych komórek macierzystych. Wyniki badań wykazały, że spadek ilości IL-1 jest spowodowany zahamowaniem jej wydzielania przez komórki mikrogleju (François i wsp., 2012; Maggini i wsp., 2010) i aktywacją przekształcania limfocytów T CD4⁺ o fenotypie prozapalnym Th1 w limfocyty przeciwzapalne Th2 (Bai i wsp., 2009; Batten i wsp., 2006). W moich badaniach zarówno podanie mezenchymalnych komórek macierzystych, jak i zewnątrzkomórkowych pęcherzyków prowadziło do obniżenia poziomu aktywowanej IL-1 α , widocznej już po upływie 24 godz od przeszczepu. Ponadto transplantacja hBM-MSCs lub EVs spowodowała znamiennej statystycznie redukcję IL-1 β w każdym punkcie czasowym, co koreluje z wynikami prac innych autorów. Ebrahim i wsp. udowodnili, że EVs pochodzące z MSCs zmniejszają wytwarzanie IL-1 podczas reakcji zapalnych indukowanych przez zrosty wewnątrzmaciczne u samic szczurów (Ebrahim i wsp., 2018), jednak ich wpływ na wydzielanie interleukiny 1 w uszkodzonym powstającym po ischemii mózgu nie został do tej pory zbadany.

Wśród czynników prozapalnych, uczestniczących w reakcjach na zmiany w tkance po niedokrwieniu uczestniczy czynnik martwicy nowotworu α , który stymuluje apoptozę neuronów i powiększenie obszaru uszkodzenia (Pettigrew i wsp., 2008). Istnieje wiele prac opisujących modulację wydzielania TNF- α po przeszczepie mezenchymalnych komórek macierzystych do mózgu po udarze. Acosta i wsp. zaobserwowali, że po dożylnym podaniu BM-MSCs następował spadek ilości TNF- α w modelu ischemii mózgu u szczurów (Acosta i wsp., 2015). W badaniach Scheibe i wsp. nie wykazano istotnych statystycznie zmian w poziomie TNF- α w krwi myszy po przeszczepie komórek mezenchymalnych (Scheibe i wsp., 2012b). Z moich doświadczeń wynika, że przeszczep hBM-MSCs lub EVs prowadził do nieznacznego zmniejszenia poziomu czynnika martwicy nowotworu α w uszkodzonej tkance, silniejszy efekt był widoczny po iniekcji zewnątrzkomórkowych pęcherzyków, jednak wyniki nie były istotne statystycznie. Z uwagi na fakt, iż TNF- α produkowany jest przez uszkodzone neurony, komórki mikrogleju, astrocyty, a także limfocyty i makrofagi napływające z krwi obwodowej, być może nie dochodzi do pełnego zablokowania aktywności wszystkich tych komórek po transplantacji hBM-MSCs lub EVs.

Niezmiernie istotną rolę w reakcjach immunologicznych po udarze odgrywa interleukina 6 (IL-6), która może pełnić przeciwstawne funkcje, działając prozapalnie poprzez aktywację limfocytów T i B oraz stymulację białek ostrej fazy (Smith i wsp., 2004) lub neuroprotekcynie w stosunku do uszkodzonych struktur tkanki (Loddick i wsp., 1998). Doświadczenia Karlupia i wsp. wykazały, że dotętnicze podanie MSCs prowadzi do obniżenia poziomu IL-6 w modelu udaru mózgu u szczurów (Karlupia i wsp., 2014). W moich badaniach transplantacja mezenchymalnych komórek macierzystych lub zewnątrzkomórkowych pęcherzyków powodowała istotny statystycznie spadek poziomu IL-6 w mózgu biorców przeszczepu, we wszystkich punktach czasowych. Widoczny efekt może wynikać z hamującego działania hBM-MSCs i EVs na komórki mikrogleju, makrofagi czy neurony przyczyniając się do blokowania produkcji przez nie IL-6. Wyniki eksperymentów grupy Ebrahim'a, prowadzonych w innym modelu uszkodzenia tkanki, pokazały, że przeszczep EVs izolowanych

z MSCs powoduje obniżenie poziomu IL-6, której wzrost był widoczny po powstaniu zrostów wewnątrzmacicznych u samic szczurów (Ebrahim i wsp., 2018).

Funkcje prozapalne po udarze mózgu pełni także interferon- γ , którego najważniejszym działaniem jest aktywacja produkcji chemokiny-białka 10 indukowanego przez interferon γ (Zhang i wsp., 2014). Badania wielu autorów wykazały, iż mezenchymalne komórki macierzyste mają zdolność do obniżenia poziomu interferonu γ poprzez aktywację przekształcania komórek mikrogleju/makrofagów prozapalnych M1 w komórki przeciwzapalne M2 (François i wsp., 2012; Maggini i wsp., 2010) oraz indukowania polaryzacji limfocytów pomocniczych Th1 do Th2 (Bai i wsp., 2009; Batten i wsp., 2006). Scheibe i wsp. nie zaobserwowali istotnych statystycznie zmian w poziomie INF- γ po przeszczepie MSCs w mysim modelu ischemii mózgu (Scheibe i wsp., 2012b). Moje badania pokazały, że podanie mezenchymalnych komórek macierzystych lub zewnątrzkomórkowych pęcherzyków prowadziło do obniżenia poziomu interferonu γ , istotnego statystycznie 1 dzień po transplantacji EVs. Być może zmiany te są wynikiem aktywacji przekształcania limfocytów Th1 do fenotypu Th2 oraz blokowaniem działania limfocytów T CD8⁺ i komórek NK, przez co nie dochodzi do produkcji INF- γ przez te komórki, efekt zaobserwowany w badaniach *in vitro*.

Do cytokin wykazujących działanie regulatorowe należy interleukina 4. Wydaje się, że pełni te funkcje poprzez kontrolę różnicowania limfocytów T i B oraz komórek mikrogleju (Zhao i wsp., 2015). Istnieją także prace wskazujące na jej przeciwzapalne działanie. IL-4 produkowana jest przez limfocyty Th2, a także komórki stymulujące procesy zapalne takie, jak: komórki NK, bazofile, komórki tuczne (Paul, 2015) oraz uszkodzone neurony (Zhao i wsp., 2015), przez co może kontrolować reakcje tkankowe po uszkodzeniu mózgu, pełniąc zarówno funkcję prozapalną, jak i przeciwzapalną. W wykonanych przeze mnie doświadczeniach transplantacja hBM-MSCs lub EVs prowadziła do obniżenia poziomu IL-4, wykazując znamienne statystyczny spadek w różnych punktach czasowych. Podobnie, zmniejszenie produkcji IL-4 w modelu ischemii mózgu u szczurów obserwowano po przeszczepie UC-MSCs i kwercetyny (Zhang i wsp., 2016).

Wśród cytokin o działaniu przeciwzapalnym istotną rolę odgrywa interleukina 10. Wydaje się, że poprzez hamowanie wydzielania cytokin prozapalnych może działać protekcyjnie na tkankę nerwową uszkodzoną w wyniku niedokrwienia (Picascia i wsp., 2015). Badania Nakajima i wsp. wykazały zwiększoną produkcję IL-10 po przeszczepie MSCs w modelu ischemii mózgu u szczurów (Nakajima i wsp., 2017). W przeprowadzonych przeze mnie badaniach poziom IL-10 analizowany po przeszczepie mezenchymalnych komórek macierzystych lub zewnątrzkomórkowych pęcherzyków nie ulegał istotnym zmianom. Być może wynika to ze zbyt krótkiego czasu obserwacji. Z prac innych autorów wynika, że efekt wzmożonej produkcji IL-10 jest widoczny w dłuższym czasie od transplantacji. Czasowa zależność wydzielania IL-10 została wykazana przez Wang'a i wsp., okazało się, że do najsilniejszej produkcji IL-10 dochodzi po upływie 7 dni od podania MSCs, a wysoki poziom IL-10 utrzymuje się do 28 dni od przeszczepu komórek (Wang i wsp., 2015). Przeszczepiając mikropecherzyki pochodzące z MSCs, Lee i wsp. opisali wzrost wydzielania IL-10 w tkance nerwowej szczurów uszkodzonej w wyniku udaru niedokrwienego (Lee i wsp., 2016).

Pojawiający się w mózgu po niedokrwieniu transformujący czynnik wzrostu β hamuje wydzielanie chemokin i przeciwdziała apoptozie komórek w tkance nerwowej (Amantea i wsp., 2015). Badania ostatnich lat dowiodły, że TGF- β 1 może także działać prozapalnie, a jego podwyższone stężenie obserwowane było w mózgu zwierząt uszkodzonym w wyniku ischemii (Xin i wsp., 2013c). Autorzy wielu prac opisują zmiany wydzielania TGF- β po transplantacji mezenchymalnych komórek macierzystych (Chen i wsp., 2003; Kong i wsp., 2009; Zhao i wsp., 2012). W ostatnich latach prowadzonych jest coraz więcej doświadczeń analizujących działanie poszczególnych izoform TGF- β , wskazujących na ich rolę zarówno protekcyjną, jak i prozapalną.

Analiza wydzielania poszczególnych typów TGF- β po uszkodzeniu mózgu i transplantacji mezenchymalnych komórek macierzystych lub zewnątrzkomórkowych pęcherzyków została również przeprowadzona w moich badaniach.

Xin i wsp. zaobserwowali, że wydzielanie TGF- β 1 jest zwiększone po uszkodzeniu tkanki nerwowej imitującym udar niedokrwienny, a przeszczep MSCs obniża ekspresję tej cytokiny w komórkach mikrogleju/makrofagach i astrocytach (Xin i wsp., 2013c). Moje badania pokazały, że poziom TGF- β 1 oceniany w mózgu po ischemii ulegał obniżeniu po przeszczepie hBM-MSCs lub EVs, największe zmiany zanotowano po upływie 7 dni od transplantacji choć nie były one istotne statystycznie. W przeprowadzonych przeze mnie doświadczeniach widoczny był istotnie statystyczny spadek poziomu TGF- β 2 po podaniu hBM-MSCs lub EVs w czasie 3 i 7 dni od uszkodzenia mózgu. Wyniki te sugerują na udział TGF- β 1 i TGF- β 2 w reakcjach „prozapalnych” po ischemii mózgu i wyciszaniu ich po podaniu komórek lub wyizolowanych z nich pęcherzyków. Przy ocenie poziomu TGF- β 3 po transplantacji hBM-MSCs lub EVs szczurom poddanym ischemii mózgu obserwowany był niewielki nie istotny statystycznie wzrost TGF- β 3. Być może TGF- β 3 w odróżnieniu od podjednostek TGF- β 1 i TGF- β 2 ma właściwości przeciwzapalne i jest wydzielana w zwiększonej ilości po podaniu mezenchymalnych komórek macierzystych lub zewnątrzkomórkowych pęcherzyków w naszym modelu doświadczalnym.

Obok cytokin istotną rolę w odpowiedzi gospodarza na niedokrwienie pełnią chemokiny. Prace licznych autorów wykazały, że uszkodzenie mózgu spowodowane ischemią prowadzi do zwiększonego wytwarzania chemokin. Silva i wsp. udowodnili, że podwyższenie poziomu CXCL-1 po udarze niedokrwiennym skutkuje infiltracją neutrofilii i zwiększonym obumieraniem komórek neuralnych w obszarze uszkodzenia (Silva i wsp., 2015). Donizetti-Oliveira i wsp. zaobserwowali istotny statystycznie spadek CXCL-1 po podaniu tłuszczowych komórek macierzystych w modelu choroby nerek (Donizetti-Oliveira i wsp., 2012). Wpływ transplantacji MSCs i EVs na poziom tej chemokiny w udarze niedokrwiennym mózgu nie został do tej pory zbadany. W moich doświadczeniach przeszczep hBM-MSCs lub EVs prowadził do znamiennego statystycznie obniżenia poziomu CXCL-1 we wszystkich punktach czasowych. Tak silny spadek wartości CXCL1 jest związany prawdopodobnie z zahamowaniem komórek mikrogleju po przeszczepie MSCs lub EVs.

Inną chemokiną mającą efekt prozapalny jest białko chemotaktyczne monocytów 1, które indukuje infiltrację monocytów, aktywuje produkcję cytokin prozapalnych i przyczynia się do zwiększenia obszaru uszkodzenia (Dimitrijevic i wsp., 2007; Strecker i wsp., 2013). Doświadczenia Yoo i wsp. wykazały obniżenie poziomu MCP-1 po przeszczepie mezenchymalnych komórek macierzystych w modelu udaru niedokrwiennego mózgu (Yoo i wsp., 2013). Ponadto Wang i współpracownicy udowodnili, że MCP-1 uwalniany przez komórki w miejscu dotkniętym ischemią nasila migrację MSCs do obszaru uszkodzenia (Wang i wsp., 2002). Wpływ podania zewnątrzkomórkowych pęcherzyków na regulację poziomu MCP-1 w modelu udaru niedokrwiennego nie został do tej pory opisany. W moich badaniach dotętnicza transplantacja hBM-MSCs, podobnie jak EVs, do uszkodzonego prądkowia szczura prowadziła do istotnego statystycznie obniżenia MCP-1. Spadek ilości MCP-1 korelował z obniżeniem aktywacji komórek mikrogleju i astrocytów w mózgu biorców przeszczepu.

Ważne funkcje w reakcjach immunologicznych po ischemii mózgu pełnią także białka zapalne makrofagów (MIP): MIP-1 α (CCL3) i MIP-3 α (CCL20). Liczne badania dowiodły, że MIP-1 α stymuluje napływ monocytów do uszkodzonej tkanki, jak również pobudza astrocyty i komórki mikrogleju (Cowell i wsp., 2002). Badania wykazały, że MIP-1 α , podobnie jak MCP-1, zwiększa migrację mezenchymalnych komórek macierzystych do miejsca dotkniętego ischemią po ich transplantacji (Wang i wsp., 2002). W moich doświadczeniach przeszczep komórek mezenchymalnych lub pochodzących z nich zewnątrzkomórkowych pęcherzyków prowadził

do istotnego statystycznie obniżenia poziomu MIP-1 α we wszystkich punktach czasowych. Rola EVs w regulacji poziomu MIP-1 α reakcjach „zapalnych” spowodowanych udarem niedokrwiennym nie została do tej pory zbadana. Najnowsze prace pokazują jednak, że EVs wyizolowane z MSCs zmniejszają wydzielanie MIP-1 α w mysim modelu uszkodzenia rdzenia kręgowego (Sun i wsp., 2018).

Istotą działania MIP-3 α jest stymulacja wydzielania IL-1 β i aktywacja syntazy tlenu azotu, co powoduje zwiększenie uszkodzenia powstałego w wyniku ischemii mózgu (Terao i wsp., 2009). Badania Terao i wsp. wykazały, że zablokowanie produkcji MIP-3 α prowadzi do zmniejszenia obszaru lezji po niedokrwieniu mózgu u szczurów (Terao i wsp., 2009). W moich doświadczeniach podanie MSCs lub EVs zwierzętom w modelu uszkodzenia mózgu prowadziło do istotnej statystycznie redukcji wydzielania MIP-3 α . W związku z tym, że MIP-3 α produkowane jest głównie przez aktywowane astrocyty, zmniejszenie liczby astrocytów obserwowane przez nas po transplantacji mezenchymalnych komórek macierzystych lub zewnątrzkomórkowych pęcherzyków powodowało obniżenie poziomu tej cytokiny w tkance nerwowej po ischemii.

Wyniki moich badań, przedstawione w rozprawie doktorskiej, podobnie jak wcześniejsze nieliczne doświadczenia innych autorów, wykazały, że podanie mezenchymalnych komórek macierzystych powoduje obniżenie poziomu cytokin i chemokin prozapalnych oraz jednoczesny wzrost czynników przeciwzapalnych w mózgu szczurów po cytotoksycznym uszkodzeniu prądkowia. Co ciekawe, przeszczepiane dotętniczo zewnątrzkomórkowe pęcherzyki mają zdolność immunomodulacyjnego działania na komórki mózgu gospodarza porównywalną z efektem komórek mezenchymalnych, z których zostały izolowane. Te nowatorskie poczynione przez nas obserwacje są przedmiotem zgłoszenia patentowego, wydają się być także cenne z punktu widzenia przyszłych możliwości zastosowań klinicznych.

7. Podsumowanie

- Opracowano metodę izolacji zewnątrzkomórkowych pęcherzyków (EVs) z ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego (hBM-MSCs) i ich znakowania PKH26 lub nanocząstkami żelaza skoniugowanymi z rodaminą (Molday ION), umożliwiającymi wizualizację zarówno *in vitro* jak *in vivo*
- Wykazano, iż znakowanie zewnątrzkomórkowych pęcherzyków PKH26 lub Molday ION nie ogranicza ich migracji obserwowanej zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*
- Komórki hBM-MSCs lub pochodzące z nich zewnątrzkomórkowe pęcherzyki podawane do prawej tętnicy szyjnej szczura lokalizują się w mózgu biorcy w okolicy wywołanego wcześniej uszkodzenia
- Po transplantacji hBM-MSCs lub EVs obserwuje się zmniejszenie aktywacji komórek mikrogleju oraz liczby leukocytów, w tym limfocytów T CD8⁺ w mózgu zwierząt, których wzrost był spowodowany cytotoksycznym uszkodzeniem prążkowiec
- Analiza cytokin oraz chemokin w mózgu szczurów wykazała, że przeszczep hBM-MSCs lub EVs powodował obniżenie poziomu cytokin prozapalnych, w tym IL-1 α , IL-1 β , IL-6 i IFN γ oraz chemokin, takich jak CXCL1, MIP-1 α , MIP-3 α i MCP-1, których zwiększenie obserwowano w wyniku cytotoksycznego uszkodzenia mózgu

8. Wnioski

- Opracowana przez nas metoda izolacji zewnątrzkomórkowych pęcherzyków z ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego umożliwiła otrzymanie czystej populacji EVs, pozbawionej *debris* komórkowego
- Zmodyfikowana technika dotętnicznej transplantacji pozwoliła na bezpośredni transfer podawanych komórek i zewnątrzkomórkowych pęcherzyków do półkuli mózgu tożsamej z miejscem uszkodzenia
- Przeszczepiane dotętniczo zewnątrzkomórkowe pęcherzyki mają zdolność immunomodulacyjnego działania na komórki mózgu gospodarza, efekt ten jest porównywalny z działaniem komórek mezenchymalnych, z których zostały wyizolowane
- Wydaje się, że systemowa transplantacja zewnątrzkomórkowych pęcherzyków w porównaniu z przeszczepem komórek może być bardziej bezpieczna ze względu na ich mniejszy rozmiar i słabą immunogenność związaną z brakiem lub niską ekspresją antygenów

9. Spis piśmiennictwa

- Acosta SA, Tajiri N, Hoover J, Kaneko Y, Borlongan CV. "Intravenous Bone Marrow Stem Cell Grafts Preferentially Migrate to Spleen and Abrogate Chronic Inflammation in Stroke." *Stroke*, 2015: 46(9):2616-27.
- Adamiak M, Cheng G, Bobis-Wozowicz S, Zhao L, Kedracka-Krok S, Samanta A, Karnas E, Xuan YT, Skupien-Rabian B, Chen X, Jankowska U, Girgis M, Sekula M, Davani A, Lasota S, Vincent RJ, Sarna M, Newell KL, Wang OL, Dudley N, Madeja Z, Dawn B, Zuba-Surma EK. "Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Extracellular Vesicles Are Safer and More Effective for Cardiac Repair Than iPSCs." *Circ Res.*, 2018: 122(2):296-309.
- Agnati LF, Fuxe K. "Extracellular-vesicle type of volume transmission and tunnelling-nanotube type of wiring transmission add a new dimension to brain neuro-glial networks." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 2014: 369(1652).
- Ahmad M, Dar N J, Bhat Z S, Hussain A, Shah A, Liu H, Graham S H. "Inflammation in ischemic stroke: mechanisms, consequences and possible drug targets." *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2014: 13(8):1378-96.
- Alimperti S, You H, George T, Agarwal SK, Andreadis ST. "Cadherin-11 regulates both mesenchymal stem cell differentiation into smooth muscle cells and the development of contractile function in vivo." *J Cell Sci.*, 2014: 127(Pt 12):2627-38.
- Altmann P, Mildner M, Haider T, Traxler D, Beer L, Ristl R, Golabi B, Gabriel C, Leutmezer F, Ankersmit HJ. "Secretomes of apoptotic mononuclear cells ameliorate neurological damage in rats with focal ischemia." *Version 2. F1000Res.*, 2014: 3:131.
- Amantea D, Bagetta G, Tassorelli C, Mercuri NB, Corasaniti MT. "Identification of distinct cellular pools of interleukin-1beta during the evolution of the neuroinflammatory response induced by transient middle cerebral artery occlusion in the brain of rat." *Brain Res.* , 2010: 1313:259-69.
- Amantea D, Micieli G, Tassorelli C, Cuartero M I, Ballesteros I, Certo M, Moro M A, Lizasoain I, Bagetta G. "Rational modulation of the innate immune system for neuroprotection in ischemic stroke." *Front Neurosci.*, 2015: 9:147.
- Anthony BA, Link DC. "Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells." *Trends Immunol.*, 2014: 35(1):32-7.
- Antonucci F, Turola E, Riganti L, Caleo M, Gabrielli M, Perrotta C, Novellino L, Clementi E, Giussani P, Viani P, Matteoli M, Verderio C. "Microvesicles released from microglia stimulate synaptic activity via enhanced sphingolipid metabolism." *EMBO J.* , 2012: 31(5):1231-40.
- Armesilla-Diaz A, Elvira G, Silva A. "p53 regulates the proliferation, differentiation and spontaneous transformation of mesenchymal stem cells." *Exp Cell Res.*, 2009: 315(20):3598-610.
- Arumugam TV, Woodruff TM, Lathia JD, Selvaraj PK, Mattson MP, Taylor SM. "Neuroprotection in stroke by complement inhibition and immunoglobulin therapy." *Neuroscience*, 2009: 158(3):1074-89.
- Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. "Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway." *Eur J Immunol.*, 2005: 35(5):1482-90.
- Baglio SR, Rooijers K, Koppers-Lalic D, Verweij FJ, Pérez Lanzón M, Zini N, Naaijken B, Perut F, Niessen HW, Baldini N, Pegtel DM. "Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species." *Stem Cell Res Ther.*, 2015: 6:127.

- Bai C, Gao Y, Li Q, Feng Y, Yu Y, Meng G, Zhang M, Guan W. "Differentiation of chicken umbilical cord mesenchymal stem cells into beta-like pancreatic islet cells." *Artif Cells Nanomed Biotechnol.*, 2015: 43(2):106-11.
- Bai L, Lennon DP, Eaton V, Maier K, Caplan AI, Miller SD, Miller RH. "Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis." *Glia*, 2009: 57(11):1192-203.
- Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, Ratajczak J, Vilaire G, Kijowski J, Reza R, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. "Platelet-derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells." *Exp Hematol.*, 2002: 30(5):450-9.
- Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G. "Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients." *Ann Neurol.*, 2005: 57(6):874-82.
- Barbosa da Fonseca LM, Gutfilen B, Rosado de Castro PH, Battistella V, Goldenberg RC, Kasai-Brunswick T, Chagas CL, Wajnberg E, Maiolino A, Salles Xavier S, Andre C, Mendez-Otero R, de Freitas GR. "Migration and homing of bone-marrow mononuclear cells in chronic ischemic stroke after intra-arterial injection." *Exp Neurol.*, 2010: 221(1):122-8.
- Basic Kes V, Simundic AM, Nikolac N, Topic E, Demarin V. "Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in acute ischemic stroke and their relation to early neurological deficit and stroke outcome." *Clin Biochem.*, 2008: 41(16-17):1330-4.
- Batagov AO, Kurochkin IV. "Exosomes secreted by human cells transport largely mRNA fragments that are enriched in the 3'-untranslated regions." *Biol Direct.*, 2013: 8:12.
- Batten P, Sarathchandra P, Antoniw JW, Tay SS, Lowdell MW, Taylor PM, Yacoub MH. "Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy and downregulate T cell allo-responses via the TH2 pathway: relevance to tissue engineering human heart valves." *Tissue Eng.*, 2006: 12(8):2263-73.
- Battistella V, de Freitas GR, da Fonseca LM, Mercante D, Gutfilen B, Goldenberg RC, Dias JV, Kasai-Brunswick TH, Wajnberg E, Rosado-de-Castro PH, Alves-Leon SV, Mendez-Otero R, Andre C. "Safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with nonacute ischemic stroke." *Regen Med.*, 2011: 6(1):45-52.
- Bernal A, Fernández M, Pérez LM, San Martín N, Gálvez BG. "Method for obtaining committed adult mesenchymal precursors from skin and lung tissue." *PLoS One.*, 2012: 7(12):e53215.
- Bhasin A, Srivastava MV, Kumaran SS, Mohanty S, Bhatia R, Bose S, Gaikwad S, Garg A, Airan B. "Autologous mesenchymal stem cells in chronic stroke." *Cerebrovasc Dis Extra.*, 2011: 1(1):93-104.
- Bhasin A, Srivastava MV, Mohanty S, Bhatia R, Kumaran SS, Bose S. "Stem cell therapy: a clinical trial of stroke." *Clin Neurol Neurosurg.*, 2013: 115(7):1003-8.
- Bhaskar S, Stanwell P, Cordato D, Attia J, Levi C. "Reperfusion therapy in acute ischemic stroke: dawn of a new era?" *BMC Neurol.*, 2018: 18(1):8.
- Bhatnagar S, Shinagawa K, Castellino FJ, Schorey JS. "Exosomes released from macrophages infected with intracellular pathogens stimulate a proinflammatory response in vitro and in vivo." *Blood.*, 2007: 110(9):3234-44.
- Bian S, Zhang L, Duan L, Wang X, Min Y, Yu H. "Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model." *J Mol Med (Berl).*, 2014: 92(4):387-97.
- Biancone L, Bruno S, Deregibus MC, Tetta C, Camussi G. "Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles." *Nephrol Dial Transplant.*, 2012: 27(8):3037-42.

- Blois SM, Ilarregui JM, Tometten M, Garcia M, Orsal AS, Cordo-Russo R, Toscano MA, Bianco GA, Kobelt P, Handjiski B, Tirado I, Markert UR, Klapp BF, Poirier F, Szekeres-Bartho J, Rabinovich GA, Arck PC. "A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance." *Nat Med.*, 2007; 13(12):1450-7.
- Bobis S, Jarocho D, Majka M. "Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications." *Folia Histochem Cytobiol.* , 2006; 44(4):215-30.
- Boldrini M, Fulmore CA, Tartt AN, Simeon LR, Pavlova I, Poposka V, Rosoklija GB, Stankov A, Arango V, Dwork AJ, Hen R, Mann JJ. "Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging." *Cell Stem Cell*, 2018; 22(4):589-599.e5.
- Bornstein N M, Aronovich B, Korczyn A D, Shavit S, Michaelson D M, Chapman J. "Antibodies to brain antigens following stroke." *Neurology.*, 2001; 56(4):529-30.
- Bronckaers A, Hilkens P, Martens W, Gervois P, Ratajczak J, Struys T, Lambrechts I. "Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis." *Pharmacol Ther.*, 2014; 143(2):181-96.
- Brooke G, Tong H, Levesque JP, Atkinson K. "Molecular trafficking mechanisms of multipotent mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and placenta." *Stem Cells Dev.* , 2008; 17(5):929-40.
- Bruno S, Grange C, Deregibus MC, Calogero RA, Saviozzi S, Collino F, Morando L, Busca A, Falda M, Bussolati B, Tetta C, Camussi G. "Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury." *J Am Soc Nephrol.*, 2009; 20(5):1053-67.
- Budoni M, Fierabracci A, Luciano R, Petrini S, Di Ciommo V, Muraca M. "The immunosuppressive effect of mesenchymal stromal cells on B lymphocytes is mediated by membrane vesicles." *Cell Transplant.*, 2013; 22(2):369-79.
- Bunnell BA, Flaas M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. "Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation." *Methods.* , 2008; 45(2):115-20. .
- Busato A, Bonafede R, Bontempi P, Scambi I, Schiaffino L, Benati D, Malatesta M, Sbarbati A, Marzola P, Mariotti R. "Magnetic resonance imaging of ultrasmall superparamagnetic iron oxide-labeled exosomes from stem cells: a new method to obtain labeled exosomes." *Int J Nanomedicine* , 2016; 11:2481-90.
- Byun JS, , Kwak BK, Kim JK, Jung J, Ha BC, Park S. "Engraftment of Human Mesenchymal Stem Cells in a Rat Photothrombotic Cerebral Infarction Model : Comparison of Intra-Arterial and Intravenous Infusion Using MRI and Histological Analysis." *J Korean Neurosurg Soc.*, 2013; 54(6): 467–476.
- Candelario-Jalil E, González-Falcón A, García-Cabrera M, León OS, Fiebich BL. "Post-ischaemic treatment with the cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide reduces blood-brain barrier disruption and leukocyte infiltration following transient focal cerebral ischaemia in rats." *J Neurochem.* , 2007; 100(4):1108-20.
- Caplan AI. "Mesenchymal stem cells." *J Orthop Res.*, 1991; 9(5):641-50.
- Caplan AI. "Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name!" *Stem Cells Transl Med.*, 2017; 6(6):1445-1451.
- Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, Planas AM. "Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation." *Lancet Neurol.*, 2016; 15(8):869-881.
- Chan JL, Tang KC, Patel AP, Bonilla LM, Pierobon N, Ponzio NM, Rameshwar P. "Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma." *Blood*, 2006; 107(12):4817-24. .
- Charbord, P. "Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts." *Hum Gene Ther.*, 2010; 21(9):1045-56.

- Che X, Ye W, Panga L, Wu DC, Yang GY. "Monocyte chemoattractant protein-1 expressed in neurons and astrocytes during focal ischemia in mice." *Brain Res.*, 2001: 902(2):171-7.
- Chen J, Chopp M. "Exosome Therapy for Stroke." *Stroke*, 2018: 49(5):1083-1090.
- Chen J, Liu Z, Hong MM, Zhang H, Chen C, Xiao M, Wang J, Yao F, Ba M, Liu J, Guo ZK, Zhong J. "Proangiogenic compositions of microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells." *PLoS One*, 2014: 9(12):e115316.
- Chen KH, Chen CH, Wallace CG, Yuen CM, Kao GS, Chen YL, Shao PL, Chen YL, Chai HT, Lin KC, Liu CF, Chang HW, Lee MS, Yip HK. "Intravenous administration of xenogenic adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSC) and ADMSC-derived exosomes markedly reduced brain infarct volume and preserved neurological function in rat after acute ischemic stroke." *Oncotarget*, 2016: 7(46):74537-74556.
- Chen TS, Lim SK. "Measurement of precursor miRNA in exosomes from human ESC-derived mesenchymal stem cells." *Methods Mol Biol.*, 2013: 1024:69-86.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3." *J Exp Med.*, 2003: 198(12):1875-86.
- Cheng MT, Yang HW, Chen TH, Lee OK. "Isolation and characterization of multipotent stem cells from human cruciate ligaments." *Cell Prolif.*, 2009: 42(4):448-60.
- Chiesa S, Morbelli S, Morando S, Massollo M, Marini C, Bertoni A, Frassoni F, Bartolomé ST, Sambuceti G, Traggiati E, Uccelli A. "Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells." *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2011: 108(42):17384-9.
- Choi DS, Kim DK, Kim YK, Gho YS. "Proteomics, transcriptomics and lipidomics of exosomes and ectosomes." *Proteomics*, 2013: 13(10-11):1554-71.
- Chung DJ, Choi CB, Lee SH, Kang EH, Lee JH, Hwang SH, Han H, Lee JH, Choe BY, Lee SY, Kim HY. "Intraarterially delivered human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in canine cerebral ischemia." *J Neurosci Res.*, 2009: 87(16):3554-67.
- Clarkson BD, Ling C, Shi Y, Harris MG, Rayasam A, Sun D, Salamat MS, Kuchroo V, Lambris JD, Sandor M, Fabry Z. "T cell-derived interleukin (IL)-21 promotes brain injury following stroke in mice." *J Exp Med.*, 2014: 211(4):595-604.
- Clayton A, Turkes A, Dewitt S, Steadman R, Mason MD, Hallett MB. "Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: the role of integrins." *FASEB J.*, 2004: 18(9):977-9.
- Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J. "Shedding microvesicles: artefacts no more." *Trends Cell Biol.*, 2009: 19(2):43-51.
- Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. "Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells." *Proc Natl Acad Sci U S A.* , 2001: 98(14):7841-5.
- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. "Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions." *Blood*, 2006: 107(1):367-72.
- Cowell RM, Xu H, Galasso JM, Silverstein FS. "Hypoxic-ischemic injury induces macrophage inflammatory protein-1alpha expression in immature rat brain." *Stroke*, 2002: 33(3):795-801.
- Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, Gaupp D, Phinney DG. "Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neurogenesis." *Exp Neurol.*, 2006: 198(1):54-64.

- Cuartero M I, Ballesteros I, Moraga A, Nombela F, Vivancos J, Hamilton J A, Corbí Á L, Lizasoain I, Moro M A. "N2 neutrophils, novel players in brain inflammation after stroke: modulation by the PPAR γ agonist rosiglitazone." *Stroke*, 2013; 44(12):3498-508.
- Cunningham LA, Wetzel M, Rosenberg GA. "Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia." *Glia*, 2005; 50(4):329-39.
- Dabrowska S, Sypecka J, Jablonska A, Strojek L, Wielgos M, Domanska-Janik K, Sarnowska A. "Neuroprotective Potential and Paracrine Activity of Stromal Vs. Culture-Expanded hMSC Derived from Wharton Jelly under Co-Cultured with Hippocampal Organotypic Slices." *Mol Neurobiol.*, 2018; 55(7):6021-6036.
- Del Fattore A, Luciano R, Fierabracci A, Muraca M. "Mesenchymal stem/stromal cell-derived microparticles show anti-inflammatory activity in an animal model of ulcerative colitis." *Cytotherapy* , 2014; 16(4):S25.
- Dénes A, Ferenczi S, Halász J, Környei Z, Kovács KJ. "Role of CX3CR1 (fractalkine receptor) in brain damage and inflammation induced by focal cerebral ischemia in mouse." *J Cereb Blood Flow Metab.* , 2008; 28(10):1707-21.
- Denes A, Vidyasagar R, Feng J, Narvainen J, McColl B W, Kauppinen R A, Allan S M. "Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice." *J Cereb Blood Flow Metab.* , 2007; 27(12):1941-53.
- Diaz-Solano D, Wittig O, Ayala-Grosso C, Pieruzzini R, Cardier JE. "Human olfactory mucosa multipotent mesenchymal stromal cells promote survival, proliferation, and differentiation of human hematopoietic cells." *Stem Cells Dev.* , 2012; 21(17):3187-96.
- Dimitrijevic OB, Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic AV. "Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice." *Stroke*, 2007; 38(4):1345-53.
- Dimitrijevic OB, Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic AV. "Effects of the chemokine CCL2 on blood-brain barrier permeability during ischemia-reperfusion injury." *J Cereb Blood Flow Metab.* , 2006; 26(6):797-810.
- Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. "Mesenchymal stem cells." *Cell Transplant.*, 2011; 20(1):5-14.
- Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Pence P, Bony C, Apparailly F, Cantos C, Jorgensen C, Noël D. "Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism." *Stem Cells.*, 2007; 25(8):2025-32.
- Doepfner TR Herz J, Görgens A, Schlechter J, Ludwig AK, Radtke S, de Miroshedji K, Horn PA, Giebel B, Hermann DM. "Extracellular Vesicles Improve Post-Stroke Neuroregeneration and Prevent Postischemic Immunosuppression." *Stem Cells Transl Med.*, 2015; 4(10):1131-43.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy*, 2006; 8(4):315-7.
- Dong Y, Benveniste E N. "Immune function of astrocytes." *Glia*, 2001; 36(2):180-90.
- Donizetti-Oliveira C, Semedo P, Burgos-Silva M, Cenedeze MA, Malheiros DM, Reis MA, Pacheco-Silva A, Câmara NO. "Adipose tissue-derived stem cell treatment prevents renal disease progression." *Cell Transplant.* , 2012; 21(8):1727-41.
- Dulamea AO. "The potential use of mesenchymal stem cells in stroke therapy--From bench to bedside." *J Neurol Sci.*, 2015; 352(1-2):1-11.

- Ebrahim N, Mostafa O, El Dosoky RE, Ahmed IA, Saad A, Mostafa A, Sabry D, Ibrahim K, Farid A. "Human mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles/estrogen combined therapy safely ameliorates experimentally induced intrauterine adhesions in a female rat model." *Stem Cell Res Ther.*, 2018; 9(1):175.
- Egashira Y, Sugitani S, Suzuki Y, Mishiro K, Tsuruma K, Shimazawa M, Yoshimura S, Iwama T, Hara H. "The conditioned medium of murine and human adipose-derived stem cells exerts neuroprotective effects against experimental stroke model." *Brain Res.*, 2012; 1461:87-95.
- El Bassit G, Patel RS, Carter G, Shibu V, Patel AA, Song S, Murr M, Cooper DR, Bickford PC, Patel NA. "MALAT1 in Human Adipose Stem Cells Modulates Survival and Alternative Splicing of PKC δ II in HT22 Cells." *Endocrinology*, 2017; 158(1):183-195.
- ElAli A, Jean LeBlanc N. "The Role of Monocytes in Ischemic Stroke Pathobiology: New Avenues to Explore." *Front Aging Neurosci.*, 2016; 8:29.
- Eliopoulos N, Stagg J, Lejeune L, Pommey S, Galipeau J. "Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice." *Blood*, 2005; 106(13):4057-65.
- Elvington A, Atkinson C, Kulik L, Zhu H, Yu J, Kindy MS, Holers VM, Tomlinson S. "Pathogenic natural antibodies propagate cerebral injury following ischemic stroke in mice." *J Immunol.*, 2012; 188(3):1460-8.
- English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. "Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells." *Clin Exp Immunol.* 2009 Apr;156(1):149-60., 2009; 156(1):149-60.
- English, K. "Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation." *Immunol Cell Biol.*, 2013; 91(1):19-26.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. "Neurogenesis in the adult human hippocampus." *Nat Med.*, 1998; 4(11):1313-7.
- Fitzner D, Schnaars M, van Rossum D, Krishnamoorthy G, Dibaj P, Bakhti M, Regen T, Hanisch UK, Simons M. "Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis." *J Cell Sci.*, 2011; 124(Pt 3):447-58.
- François M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J. "Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation." *Mol Ther.*, 2012; 20(1):187-95.
- Franquesa M, Hoogduijn MJ, Ripoll E, Luk F, Salih M, Betjes MG, Torras J, Baan CC, Grinyó JM, Merino AM. "Update on controls for isolation and quantification methodology of extracellular vesicles derived from adipose tissue mesenchymal stem cells." *Front Immunol.*, 2014; 5:525.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Lalykina KS. "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells." *Cell Tissue Kinet.* , 1970; 3(4):393-403.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. "Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers." *Cell Tissue Kinet.*, 1987; 20(3):263-72.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. "Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo." *Transplantation.*, 1974; 17(4):331-40.
- Friedrich MA, Martins MP, Araújo MD, Klamt C, Vedolin L, Garicochea B, Raupp EF, Sartori El Ammar J, Machado DC, Costa JC, Nogueira RG, Rosado-de-Castro PH, Mendez-Otero R, Freitas GR. "Intra-arterial infusion of autologous bone marrow mononuclear cells in patients with moderate to severe middle cerebral artery acute ischemic stroke." *Cell Transplant.*, 2012; 21 Suppl 1:S13-21.

- Frühbeis C, Fröhlich D, Kuo WP, Krämer-Albers EM. "Extracellular vesicles as mediators of neuron-glia communication." *Front Cell Neurosci.* , 2013: 7:182.
- Fu WL, Li J, Chen G, Li Q, Tang X, Zhang CH. "Mesenchymal Stem Cells Derived from Peripheral Blood Retain Their Pluripotency, but Undergo Senescence During Long-Term Culture." *Tissue Eng Part C Methods.* , 2015: 21(10):1088-97.
- Gan Y, Liu Q, Wu W, Yin JX, Bai XF, Shen R, Wang Y, Chen J, La Cava A, Poursine-Laurent J, Yokoyama W, Shi FD. "Ischemic neurons recruit natural killer cells that accelerate brain infarction." *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2014: 111(7):2704-9.
- Garcia JM, Stillings SA, Leclerc JL, Phillips H, Edwards NJ, Robicsek SA, Hoh BL, Blackburn S, Doré S. "Role of Interleukin-10 in Acute Brain Injuries." *Front Neurol.*, 2017: 8:244.
- Gardiner C, Di Vizio D, Sahoo S, Théry C, Witwer KW, Wauben M6, Hill AF. "Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey." *J Extracell Vesicles.*, 2016: 5:32945.
- Gardner OF, Alini M, Stoddart MJ. "Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Bone Marrow." *Methods Mol Biol.* , 2015: 1340:41-52.
- Gargett CE, Schwab KE, Zillwood RM, Nguyen HP, Wu D. "Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium." *Biol Reprod.*, 2009: 80(6):1136-45.
- Garín MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollón E, Wait R, Lechler RI. "Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells." *Blood*, 2007: 109(5):2058-65.
- Gelderblom M, Arunachalam P, Magnus T. "γδ T cells as early sensors of tissue damage and mediators of secondary neurodegeneration." *Front Cell Neurosci.*, 2014: 8:368.
- Gelderblom M, Gallizioli M, Ludewig P, Thom V, Arunachalam P, Rissiek B, Bernreuther C, Glatzel M, Korn T, Arumugam TV, Sedlacik J, Gerloff C, Tolosa E, Planas AM, Magnus T. "IL-23 (Interleukin-23)-Producing Conventional Dendritic Cells Control the Detrimental IL-17 (Interleukin-17) Response in Stroke." *Stroke*, 2018: 49(1):155-164.
- Gelderblom M, Leyboldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe C U, Siler D A, Arumugam T V, Orthey E, Gerloff C, Tolosa E, Magnus T. "Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke." *Stroke*, 2009: 40(5):1849-57.
- Gelderblom M, Weymar A, Bernreuther C, Velden J, Arunachalam P, Steinbach K, Orthey E, Arumugam TV, Leyboldt F, Simova O, Thom V, Friese MA, Prinz I, Hölscher C, Glatzel M, Korn T, Gerloff C, Tolosa E, Magnus T. "Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke." *Blood*, 2012: 120(18):3793-802.
- Gervois P, Wolfs E, Ratajczak J, Dillen Y, Vangansewinkel T, Hilken P, Bronckaers A, Lambrichts I, Struys T. "Stem Cell-Based Therapies for Ischemic Stroke: Preclinical Results and the Potential of Imaging-Assisted Evaluation of Donor Cell Fate and Mechanisms of Brain Regeneration." *Med Res Rev.*, 2016: 36(6):1080-1126.
- Ghali AA, Yousef MK, Ragab OA, ElZamarany EA. "Intra-arterial Infusion of Autologous Bone Marrow Mononuclear Stem Cells in Subacute Ischemic Stroke Patients." *Front Neurol.* , 2016: 7:228.
- Ghannam S, Pène J, Moquet-Torcy G, Jorgensen C, Yssel H. "Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype." *J Immunol.*, 2010: 185(1):302-12.
- Giunti D, Parodi B, Usai C, Vergani L, Casazza S, Bruzzone S, Mancardi G, Uccelli A. "Mesenchymal stem cells shape microglia effector functions through the release of CX3CL1." *Stem Cells*, 2012: 30(9):2044-53.

- Gleeson BM, Martin K, Ali MT, Kumar AH, Pillai MG, Kumar SP, O'Sullivan JF, Whelan D, Stocca A, Khider W, Barry FP, O'Brien T, Caplice NM. "Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Have Innate Procoagulant Activity and Cause Microvascular Obstruction Following Intracoronary Delivery: Amelioration by Antithrombin Therapy." *Stem Cells*, 2015: 33(9):2726-37.
- Gliem M, Mausberg AK, Lee JJ, Simiantonakis I, van Rooijen N, Hartung HP, Jander S. "Macrophages prevent hemorrhagic infarct transformation in murine stroke models." *Ann Neurol.* , 2012: 71(6):743-52.
- Gliem M, Schwaninger M, Jander S. "Protective features of peripheral monocytes/macrophages in stroke." *Biochim Biophys Acta*, 2016: 1862(3):329-38.
- Goodwin M, Sueblinvong V, Eisenhauer P, Ziats NP, LeClair L, Poynter ME, Steele C, Rincon M, Weiss DJ. "Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells inhibit Th2-mediated allergic airways inflammation in mice." *Stem Cells*, 2011: 29(7):1137-48.
- Gottfried-Blackmore A, Kaunzner UW, Idoyaga J, Felger JC, McEwen BS, Bulloch K. "Acute in vivo exposure to interferon-gamma enables resident brain dendritic cells to become effective antigen presenting cells." *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2009: 106(49):20918-23.
- Greco V, Hannus M, Eaton S. "Argosomes: a potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia." *Cell*, 2001: 106(5):633-45.
- Gregory CA, Singh H, Perry AS, Prockop DJ. "The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow." *J Biol Chem.*, 2003: 278(30):28067-78.
- Grey M, Dunning CJ, Gaspar R, Grey C, Brundin P, Sparr E, Linse S. "Acceleration of α -synuclein aggregation by exosomes." *J Biol Chem.* , 2015: 290(5):2969-82.
- Grilli M, Barbieri I, Basudev H, Brusa R, Casati C, Lozza G, Ongini E. "Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischaemic damage." *Eur J Neurosci.*, 2000: 12(7):2265-72.
- Guan M, Xu Y, Wang W, Lin S. "Differentiation into neurons of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells." *Eur Cytokine Netw.*, 2014: 25(3):58-63.
- Gutiérrez-Fernández M, Rodríguez-Frutos B, Ramos-Cejudo J, Teresa Vallejo-Cremades M, Fuentes B, Cerdán S, Díez-Tejedor E. "Effects of intravenous administration of allogenic bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on functional recovery and brain repair markers in experimental ischemic stroke." *Stem Cell Res Ther.*, 2013: 4(1):11.
- György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzás EI. "Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles." *Cell Mol Life Sci.* , 2011: 68(16):2667-88.
- Hao P, Liang Z, Piao H, Ji X, Wang Y, Liu Y, Liu R, Liu J. "Conditioned medium of human adipose-derived mesenchymal stem cells mediates protection in neurons following glutamate excitotoxicity by regulating energy metabolism and GAP-43 expression." *Metab Brain Dis.*, 2014: 29(1):193-205.
- Hayon Y, Dashevsky O, Shai E, Brill A, Varon D, Leker RR. "Platelet microparticles induce angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia." *Curr Neurovasc Res.*, 2012a: 9(3):185-92.
- Hayon Y, Shai E, Varon D, Leker RR. "The role of platelets and their microparticles in rehabilitation of ischemic brain tissue." *CNS Neurol Disord Drug Targets.*, 2012b: 11(7):921-5.
- Hedlund M, Stenqvist AC, Nagaeva O, Kjellberg L, Wulff M, Baranov V, Mincheva-Nilsson L. "Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function." *J Immunol.*, 2009: 183(1):340-51.

- Herrera MB, Fonsato V, Gatti S, Deregibus MC, Sordi A, Cantarella D, Calogero R, Bussolati B, Tetta C, Camussi G. "Human liver stem cell-derived microvesicles accelerate hepatic regeneration in hepatectomized rats." *J Cell Mol Med.*, 2010; 14(6B):1605-18.
- Hess DC, Wechsler LR, Clark WM, Savitz SI, Ford GA, Chiu D, Yavagal DR, Uchino K, Liebeskind DS, Auchus AP, Sen S, Sila CA, Vest JD, Mays RW. "Safety and efficacy of multipotent adult progenitor cells in acute ischaemic stroke (MASTERS): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial." *Lancet Neurol.*, 2017; 16(5):360-368.
- Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. "Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors." *Stem Cells.* , 2006; 24(4):1030-41.
- Honmou O, Houkin K, Matsunaga T, Niitsu Y, Ishiai S, Onodera R, Waxman SG, Kocsis JD. "Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke." *Brain*, 2011; 134(Pt 6):1790-807.
- "https://clinicaltrials.gov/[dostęp 25.05.18]"
- Hu L, Wickline SA, Hood JL. "Magnetic resonance imaging of melanoma exosomes in lymph nodes." *Magn Reson Med.*, 2014; doi: 10.1002/mrm.25376.
- Huang GT, Gronthos S, Shi S. "Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine." *J Dent Res.*, 2009; 88(9):792-806.
- Huang J, Li Y, Tang Y, Tang G, Yang GY, Wang Y. "CXCR4 antagonist AMD3100 protects blood-brain barrier integrity and reduces inflammatory response after focal ischemia in mice." *Stroke*, 2013; 44(1):190-7.
- Huang P, Gebhart N, Richelson E, Brott TG, Meschia JF, Zubair AC. "Mechanism of mesenchymal stem cell-induced neuron recovery and anti-inflammation." *Cytotherapy*, 2014; 16(10):1336-44.
- Huang S, Ge X, Yu J, Han Z, Yin Z, Li Y, Chen F, Wang H, Zhang J, Lei P. Increased miR-124-3p in microglial exosomes following traumatic brain injury inhibits neuronal inflammation and contributes to neurite outgrowth via their transfer into neurons. *FASEB J.*. 2018; 32(1):512-528.
- Hung SC, Pochampally RR, Chen SC, Hsu SC, Prockop DJ. "Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis." *Stem Cells*, 2007; 25(9):2363-70.
- Hwang DW, Choi H, Jang SC, Yoo MY, Park JY, Choi NE, Oh HJ, Ha S, Lee YS, Jeong JM, Gho YS, Lee DS. "Noninvasive imaging of radiolabeled exosome-mimetic nanovesicle using (99m)Tc-HMPAO." *Sci Rep.*, 2015; 5:15636.
- Iadecola C, Anrather J. "The immunology of stroke: from mechanisms to translation." *Nat Med.*, 2011; 17(7):796-808. .
- Ishizaka S, Horie N, Satoh K, Fukuda Y, Nishida N, Nagata I. "Intra-arterial cell transplantation provides timing-dependent cell distribution and functional recovery after stroke." *Stroke*, 2013; 44(3):720-6.
- Janowski M, Gornicka-Pawlak E, Kozłowska H, Domanska-Janik K, Gielecki J, Lukomska B. "Structural and functional characteristic of a model for deep-seated lacunar infarct in rats." *J Neurol Sci.*, 2008; 273(1-2):40-8.
- Janowski M, Lyczek A, Engels C, Xu J, Lukomska B, Bulte JW, Walczak P. "Cell size and velocity of injection are major determinants of the safety of intracarotid stem cell transplantation." *J Cereb Blood Flow Metab.*, 2013; 33(6):921-7.

- Jazedje T, Perin PM, Czeresnia CE, Maluf M, Halpern S, Secco M, Bueno DF, Vieira NM, Zucconi E, Zatz M. "Human fallopian tube: a new source of multipotent adult mesenchymal stem cells discarded in surgical procedures." *J Transl Med.*, 2009; 7:46.
- Jenjaroenpun P, Kremenska Y, Nair VM, Kremenskoy M, Joseph B, Kurochkin IV. "Characterization of RNA in exosomes secreted by human breast cancer cell lines using next-generation sequencing." *PeerJ.* , 2013; 1:e201.
- Jiang W, Liang G, Li X, Li Z, Gao X, Feng S, Wang X, Liu M, Liu Y. "Intracarotid transplantation of autologous adipose-derived mesenchymal stem cells significantly improves neurological deficits in rats after MCAo." *J Mater Sci Mater Med.*, 2014; 25(5):1357-66.
- Jiang Y, Zhu W, Zhu J, Wu L, Xu G, Liu X. "Feasibility of delivering mesenchymal stem cells via catheter to the proximal end of the lesion artery in patients with stroke in the territory of the middle cerebral artery." *Cell Transplant.*, 2013; 22(12):2291-8.
- Johnson TV, DeKorver NW, Levasseur VA, Osborne A, Tassoni A, Lorber B, Heller JP, Villasmil R, Bull ND, Martin KR, Tomarev SI. "Identification of retinal ganglion cell neuroprotection conferred by platelet-derived growth factor through analysis of the mesenchymal stem cell secretome." *Brain*, 2014; 137(Pt 2):503-19.
- Jung KO, Jo H, Yu JH, Gambhir SS, Pratz G. "Development and MPI tracking of novel hypoxia-targeted theranostic exosomes." *Biomaterials.*, 2018; 177:139-148.
- Kalani A, Chaturvedi P, Kamat PK, Maldonado C, Bauer P, Joshua IG, Tyagi SC, Tyagi N. "Curcumin-loaded embryonic stem cell exosomes restored neurovascular unit following ischemia-reperfusion injury." *Int J Biochem Cell Biol.*, 2016; 79:360-369.
- Kamiya N, Ueda M, Igarashi H, Nishiyama Y, Suda S, Okubo S, Inaba T, Katayama Y. "In vivo monitoring of arterially transplanted bone marrow mononuclear cells in a rat transient focal brain ischemia model using magnetic resonance imaging." *Neurol Res.*, 2013; 35(6):573-9.
- Kanuma T, Yamamoto T, Kobiyama K, Moriishi E, Masuta Y, Kusakabe T, Ozasa K, Kuroda E, Jounai N, Ishii KJ. "CD63-Mediated Antigen Delivery into Extracellular Vesicles via DNA Vaccination Results in Robust CD8+ T Cell Responses." *J Immunol.*, 2017; 198(12):4707-4715.
- Karaoz E, Genç ZS, Demircan PÇ, Aksoy A, Duruksu G. "Protection of rat pancreatic islet function and viability by coculture with rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells." *Cell Death Dis.*, 2010; 1:e36.
- Karlupia N, Manley NC, Prasad K, Schäfer R, Steinberg GK. "Intraarterial transplantation of human umbilical cord blood mononuclear cells is more efficacious and safer compared with umbilical cord mesenchymal stromal cells in a rodent stroke model." *Stem Cell Res Ther.*, 2014; 5(2):45.
- Kempermann G, Gage FH, Aigner L, Song H, Curtis MA, Thuret S, Kuhn HG, Jessberger S, Frankland PW, Cameron HA, Gould E, Hen R, Abrous DN, Toni N, Schinder AF, Zhao X, Lucassen PJ, Frisén J. "Human Adult Neurogenesis: Evidence and Remaining Questions." *Cell Stem Cell*, 2018; 23(1):25-30.
- Kennedy MJ, Ehlers MD. "Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity." *Annu Rev Neurosci.*, 2006; 29:325-62.
- Kilpinen L, Impola U, Sankkila L, Ritamo I, Aatonen M, Kilpinen S, Tuimala J, Valmu L, Leijoki J, Finckenberg P, Siljander P, Kankuri E, Mervaala E, Laitinen S. "Extracellular membrane vesicles from umbilical cord blood-derived MSC protect against ischemic acute kidney injury, a feature that is lost after inflammatory conditioning." *J Extracell Vesicles.* , 2013; 2.
- Kim DH, Yoo KH, Choi KS, Choi J, Choi SY, Yang SE, Yang YS, Im HJ, Kim KH, Jung HL, Sung KW, Koo HH. "Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell." *Cytokine.* , 2005a; 31(2):119-26.

- Kim E, Yang J, Beltran C D, Cho S. "Role of spleen-derived monocytes/macrophages in acute ischemic brain injury." *J Cereb Blood Flow Metab.*, 2014: 34(8):1411-9.
- Kim HS, Choi DY, Yun SJ, Choi SM, Kang JW, Jung JW, Hwang D, Kim KP, Kim DW. "Proteomic analysis of microvesicles derived from human mesenchymal stem cells." *J Proteome Res.*, 2012: 11(2):839-49.
- Kim SH, Lechman ER, Bianco N, Menon R, Keravala A, Nash J, Mi Z, Watkins SC, Gambotto A, Robbins PD. "Exosomes derived from IL-10-treated dendritic cells can suppress inflammation and collagen-induced arthritis." *J Immunol.*, 2005b: 174(10):6440-8.
- Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. "Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms." *Circ Res.*, 2004: 94(5):678-85.
- Kleinschnitz C, Kraft P, Dreykluft A, Hagedorn I, Göbel K, Schuhmann MK, Langhauser F, Helluy X, Schwarz T, Bittner S, Mayer CT, Brede M, Varallyay C, Pham M, Bendszus M, Jakob P, Magnus T, Meuth SG, Iwakura Y, Zerneck A, Sparwasser T, Nieswandt B, Stoll. "Regulatory T cells are strong promoters of acute ischemic stroke in mice by inducing dysfunction of the cerebral microvasculature." *Blood*, 2013: 121(4):679-91.
- Koç ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W. "Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH)." *Bone Marrow Transplant.*, 2002: 30(4):215-22.
- Koh W, Sheng CT, Tan B, Lee QY, Kuznetsov V, Kiang LS, Tanavde V. "Analysis of deep sequencing microRNA expression profile from human embryonic stem cells derived mesenchymal stem cells reveals possible role of let-7 microRNA family in downstream targeting of hepatic nuclear factor 4 alpha." *BMC Genomics*, 2010: 11 Suppl 1:S6.
- Kondziolka D, Wechsler L, Goldstein S, Meltzer C, Thulborn KR, Gebel J, Jannetta P, DeCesare S, Elder EM, McGrogan M, Reitman MA, Bynum L. "Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke." *Neurology*, 2000: 55(4):565-9.
- Kong QF, Sun B, Bai SS, Zhai DX, Wang GY, Liu YM, Zhang SJ, Li R, Zhao W, Sun YY, Li N, Wang Q, Peng HS, Jin LH, Li HL. "Administration of bone marrow stromal cells ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th1/Th2/Th17/Treg cell subsets through the secretion of TGF-beta." *J Neuroimmunol.*, 2009: 207(1-2):83-91.
- Koniusz S, Andrzejewska A, Muraca M, Srivastava AK, Janowski M, Lukomska B. "Extracellular Vesicles in Physiology, Pathology, and Therapy of the Immune and Central Nervous System, with Focus on Extracellular Vesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells as Therapeutic Tools." *Front Cell Neurosci.*, 2016: 10:109.
- Kordelas L, Rebmann V, Ludwig AK, Radtke S, Ruesing J, Doeppner TR, Epple M, Horn PA, Beelen DW, Giebel B. "MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease." *Leukemia*, 2014: 28(4):970-3.
- Kowal J, Tkach M, Théry C. "Biogenesis and secretion of exosomes." *Curr Opin Cell Biol.*, 2014: 29:116-25.
- Krämer-Albers EM, Bretz N, Tenzer S, Winterstein C, Möbius W, Berger H, Nave KA, Schild H, Trotter J. "Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons?" *Proteomics Clin Appl.*, 2007: 1(11):1446-61.
- Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, Kawano Y, Ishii K, Kobune M, Hirai S, Uchida H, Sasaki K, Ito Y, Kato K, Honmou O, Houkin K, Date I, Hamada H. "Mesenchymal stem cells that produce neurotrophic factors reduce ischemic damage in the rat middle cerebral artery occlusion model." *Mol Ther.*, 2005: 11(1):96-104.

- Lai CP, Breakefield XO. "Role of exosomes/microvesicles in the nervous system and use in emerging therapies." *Front Physiol.*, 2012a: 3:228.
- Lai RC, Chen TS, Lim SK. "Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease." *Regen Med.*, 2011: 6(4):481-92.
- Lai RC, Tan SS, Teh BJ, Sze SK, Arslan F, de Kleijn DP, Choo A, Lim SK. "Proteolytic Potential of the MSC Exosome Proteome: Implications for an Exosome-Mediated Delivery of Therapeutic Proteasome." *Int J Proteomics.*, 2012b: 2012:971907.
- Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, Fergusson D, Winston BW, Marshall JC, Granton J, Stewart DJ, and Canadian Critical Care Trials Group. "Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials." *PLoS One*, 2012: 7(10):e47559.
- Lambertsen KL, Biber K, Finsen B. "Inflammatory cytokines in experimental and human stroke." *J Cereb Blood Flow Metab.*, 2012: 32(9):1677-98.
- Lapchak PA, Boitano PD, de Couto G, Marbán E. "Intravenous xenogeneic human cardiosphere-derived cell extracellular vesicles (exosomes) improves behavioral function in small-clot embolized rabbits." *Exp Neurol.*, 2018: 307:109-117.
- Lappalainen RS, Narkilahti S, Huhtala T, Liimatainen T, Suuronen T, Närvänen A, Suuronen R, Hovatta O, Jolkkonen J. "The SPECT imaging shows the accumulation of neural progenitor cells into internal organs after systemic administration in middle cerebral artery occlusion rats." *Neurosci Lett.*, 2008: 440(3):246-50.
- Lavoie JR, Rosu-Myles M. "Uncovering the secrets of mesenchymal stem cells." *Biochimie.*, 2013: 95(12):2212-21.
- Le Thuc O, Blondeau N, Nahon JL, Rovère C. "The complex contribution of chemokines to neuroinflammation: switching from beneficial to detrimental effects." *Ann N Y Acad Sci.*, 2015: 1351:127-40.
- Lee JS, Hong JM, Moon GJ, Lee PH, Ahn YH, Bang OY, and STARTING collaborators. "A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke." *Stem Cells*, 2010: 28(6):1099-106.
- Lee JY, Kim E, Choi SM, Kim DW, Kim KP, Lee I, Kim HS. "Microvesicles from brain-extract-treated mesenchymal stem cells improve neurological functions in a rat model of ischemic stroke." *Sci Rep.*, 2016: 6:33038.
- Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. "In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells." *Hepatology*, 2004a: 40(6):1275-84.
- Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. "Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood." *Blood.*, 2004b: 103(5):1669-75.
- Lee SH, Jin KS, Bang OY, Kim BJ, Park SJ, Lee NH, Yoo KH, Koo HH, Sung KW. "Differential Migration of Mesenchymal Stem Cells to Ischemic Regions after Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats." *PLoS One*, 2015: 10(8):e0134920.
- Lehrmann E, Kiefer R, Christensen T, Toyka KV, Zimmer J, Diemer NH, Hartung HP, Finsen B. "Microglia and macrophages are major sources of locally produced transforming growth factor-beta1 after transient middle cerebral artery occlusion in rats." *Glia.*, 1998: 24(4):437-48.
- Leong WK, Henshall TL, Arthur A, Kremer KL, Lewis MD, Helps SC, Field J, Hamilton-Bruce MA, Warming S, Manavis J, Vink R, Gronthos S, Koblar SA. "Human adult dental pulp stem cells enhance poststroke functional recovery through non-neural replacement mechanisms." *Stem Cells Transl Med.*, 2012: 1(3):177-87.

- Li P, Gan Y, Sun BL, Zhang F, Lu B, Gao Y, Liang W, Thomson AW, Chen J, Hu X. "Adoptive regulatory T-cell therapy protects against cerebral ischemia." *Ann Neurol.*, 2013; 74(3):458-71.
- Li Q, Sun W, Wang X, Zhang K, Xi W, Gao P. "Skin-Derived Mesenchymal Stem Cells Alleviate Atherosclerosis via Modulating Macrophage Function." *Stem Cells Transl Med.*, 2015; 4(11):1294-301.
- Li Y, Huang J, He X, Tang G, Tang YH, Liu Y, Lin X, Lu Y, Yang GY, Wang Y. "Postacute stromal cell-derived factor-1 α expression promotes neurovascular recovery in ischemic mice." *Stroke*, 2014; 45(6):1822-9.
- Li YP, Paczesny S, Lauret E, Poirault S, Bordigoni P, Mekhloufi F, Hequet O, Bertrand Y, Ou-Yang JP, Stoltz JF, Miossec P, Eljaafari A. "Human mesenchymal stem cells license adult CD34+ hemopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the Notch pathway." *J Immunol.*, 2008; 180(3):1598-608.
- Liao W, Xie J, Zhong J, Liu Y, Du L, Zhou B, Xu J, Liu P, Yang S, Wang J, Han Z, Han ZC. "Therapeutic effect of human umbilical cord multipotent mesenchymal stromal cells in a rat model of stroke." *Transplantation*, 2009; 87(3):350-9.
- Liesz A, Zhou W, Mracskó É, Karcher S, Bauer H, Schwarting S, Sun L, Bruder D, Stegemann S, Cerwenka A, Sommer C, Dalpke AH, Veltkamp R. "Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke." *Brain*, 2011; 134(Pt 3):704-20.
- Liesz A, Zhou W, Na SY, Hämmerling GJ, Garbi N, Karcher S, Mracsko E, Backs J, Rivest S, Veltkamp R. "Boosting regulatory T cells limits neuroinflammation in permanent cortical stroke." *J Neurosci.*, 2013; 33(44):17350-62.
- Lin SS, Zhu B, Guo ZK, Huang GZ, Wang Z, Chen J, Wei XJ, Li Q. "Bone marrow mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect rat pheochromocytoma PC12 cells from glutamate-induced injury via a PI3K/Akt dependent pathway." *Neurochem Res.*, 2014; 39(5):922-31.
- Lin YC, Ko TL, Shih YH, Lin MY, Fu TW, Hsiao HS, Hsu JY, Fu YS. "Human umbilical mesenchymal stem cells promote recovery after ischemic stroke." *Stroke*, 2011; 42(7):2045-53.
- Lindsberg PJ, Strbian D, Karjalainen-Lindsberg ML. "Mast cells as early responders in the regulation of acute blood-brain barrier changes after cerebral ischemia and hemorrhage." *J Cereb Blood Flow Metab.*, 2010; 30(4):689-702.
- Liu R, Yang Y, Yan X, Zhang K. "Abnormalities in cytokine secretion from mesenchymal stem cells in psoriatic skin lesions." *Eur J Dermatol.*, 2013; 23(5):600-7.
- Liu X, Qu X, Chen Y, Liao L, Cheng K, Shao C, Zenke M, Keating A, Zhao RC. "Mesenchymal stem/stromal cells induce the generation of novel IL-10-dependent regulatory dendritic cells by SOCS3 activation." *J Immunol.*, 2012; 189(3):1182-92.
- Liu XS, Zhang ZG, Zhang RL, Gregg SR, Wang L, Yier T, Chopp M. "Chemokine ligand 2 (CCL2) induces migration and differentiation of subventricular zone cells after stroke." *J Neurosci Res.*, 2007; 85(10):2120-5.
- Liu YP, Seçkin H, Izci Y, Du ZW, Yan YP, Başkaya MK. "Neuroprotective effects of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells in transient focal cerebral ischemia in rats." *J Cereb Blood Flow Metab.*, 2009; 29(4):780-91.
- Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ. "Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat." *J Cereb Blood Flow Metab.*, 1998; 18(2):176-9.
- Lopez-Verrilli MA, Caviedes A, Cabrera A, Sandoval S, Wyneken U, Khoury M. "Mesenchymal stem cell-derived exosomes from different sources selectively promote neuritic outgrowth." *Neuroscience*, 2016; 320:129-39.

- Losy J, Zaremba J, Skrobański P. "CXCL1 (GRO- α) chemokine in acute ischaemic stroke patients." *Folia Neuropathol.* , 2005; 43(2):97-102.
- Lu SS, Liu S, Zu QQ, Xu XQ, Yu J, Wang JW, Zhang Y, Shi HB. "In vivo MR imaging of intraarterially delivered magnetically labeled mesenchymal stem cells in a canine stroke model." *PLoS One*, 2013; 8(2):e54963.
- Luheshi NM, Kovács KJ, Lopez-Castejon G, Brough D, Denes A. "Interleukin-1 α expression precedes IL-1 β after ischemic brain injury and is localised to areas of focal neuronal loss and penumbral tissues." *J Neuroinflammation*, 2011; 8:186.
- Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. "Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells." *Stem Cells.* , 2014; 32(6):1408-19.
- Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, Holmberg J, Piazzón IM, Nepomnaschy I, Costa H, Cañones C, Raiden S, Vermeulen M, Geffner JR. "Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile." *PLoS One*, 2010; 5(2):e9252.
- Mahmoudifar N, Doran PM. "Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Adipose Tissue." *Methods Mol Biol.* , 2015: 1340:53-64.
- Mathivanan S, Fahner CJ, Reid GE, Simpson RJ. "ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids." *Nucleic Acids Res.*, 2012; 40(Database issue):D1241-4.
- Mathivanan S, Ji H, Simpson RJ. "Exosomes: extracellular organelles important in intercellular communication." *J Proteomics*, 2010; 73(10):1907-20.
- Matsuda S, Wen TC, Morita F, Otsuka H, Igase K, Yoshimura H, Sakanaka M. "Interleukin-6 prevents ischemia-induced learning disability and neuronal and synaptic loss in gerbils." *Neurosci Lett.*, 1996; 204(1-2):109-12.
- Mead B, Logan A, Berry M, Leadbeater W, Scheven BA. "Paracrine-mediated neuroprotection and neuritogenesis of axotomised retinal ganglion cells by human dental pulp stem cells: comparison with human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells." *PLoS One*, 2014; 9(10):e109305.
- Mellman I, Emr SD. "A Nobel Prize for membrane traffic: vesicles find their journey's end." *J Cell Biol.*, 2013; 203(4):559-61.
- Miki Y, Nonoguchi N, Ikeda N, Coffin RS, Kuroiwa T, Miyatake S. "Vascular endothelial growth factor gene-transferred bone marrow stromal cells engineered with a herpes simplex virus type 1 vector can improve neurological deficits and reduce infarction volume in rat brain ischemia." *Neurosurgery*, 2007; 61(3):586-94.
- Miksa M, Wu R, Dong W, Komura H, Amin D, Ji Y, Wang Z, Wang H, Ravikumar TS, Tracey KJ, Wang P. "Immature dendritic cell-derived exosomes rescue septic animals via milk fat globule epidermal growth factor-factor VIII [corrected]." *J Immunol.*, 2009; 183(9):5983-90.
- Mitkari B, Kerkelä E, Nystedt J, Korhonen M, Mikkonen V, Huhtala T, Jolkkonen J. "Intra-arterial infusion of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells results in transient localization in the brain after cerebral ischemia in rats." *Exp Neurol.*, 2013; 239:158-62.
- Mokarizadeh A, Delirezh N, Morshedi A, Mosayebi G, Farshid AA, Mardani K. "Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: potent organelles for induction of tolerogenic signaling." *Immunol Lett.*, 2012; 147(1-2):47-54.
- Moniche F, Gonzalez A, Gonzalez-Marcos JR, Carmona M, Piñero P, Espigado I, Garcia-Solis D, Cayuela A, Montaner J, Boada C, Rosell A, Jimenez MD, Mayol A, Gil-Peralta A. "Intra-arterial bone marrow mononuclear cells in ischemic stroke: a pilot clinical trial." *Stroke*, 2012; 43(8):2242-4.

- Monleón I, Martínez-Lorenzo MJ, Monteagudo L, Lasierra P, Taulés M, Iturralde M, Piñeiro A, Larrad L, Alava MA, Naval J, Anel A. "Differential secretion of Fas ligand- or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T cells." *J Immunol.*, 2001; 167(12):6736-44.
- Mosser DM, Edwards JP. "Exploring the full spectrum of macrophage activation." *Nat Rev Immunol.*, 2008; 8(12):958-69.
- Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, Kato S, Ito M, Hotta T, Ando K. "Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment." *Blood.*, 2006; 107(5):1878-87.
- Murphy S, Gibson CL. "Nitric oxide, ischaemia and brain inflammation." *Biochem Soc Trans.* , 2007; 35(5):1133-7.
- Murphy SV, Atala A. "Amniotic fluid and placental membranes: unexpected sources of highly multipotent cells." *Semin Reprod Med.* , 2013; 31(1):62-8.
- Nagayama M, Aber T, Nagayama T, Ross ME, Iadecola C. "Age-dependent increase in ischemic brain injury in wild-type mice and in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene." *J Cereb Blood Flow Metab.*, 1999; 19(6):661-6.
- Nakajima M Nito C, Sowa K, Suda S, Nishiyama Y, Nakamura-Takahashi A, Nitahara-Kasahara Y, Imagawa K, Hirato T, Ueda M, Kimura K, Okada T. "Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Interleukin-10 Promote Neuroprotection in Experimental Acute Ischemic Stroke." *Mol Ther Methods Clin Dev.* , 2017; 6:102-111.
- Namestnikova D, Gubskiy I, Kholodenko I, Melnikov P, Sukhinich K, Gabashvili A, Vishnevskiy D, Soloveva A, Abakumov M, Vakhrushev I, Lupatov A, Chekhonin V, Gubsky L, Yarygin K. "Methodological aspects of MRI of transplanted superparamagnetic iron oxide-labeled mesenchymal stem cells in live rat brain." *PLoS One*, 2017; 12(10):e0186717.
- Nauta AJ, Fibbe WE. "Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells." *Blood*, 2007; 110(10):3499-506.
- Nawashiro H, Tasaki K, Ruetzler CA, Hallenbeck JM. "TNF-alpha pretreatment induces protective effects against focal cerebral ischemia in mice." *J Cereb Blood Flow Metab.* , 1997 ; 17(5):483-90.
- Neumann J, Henneberg S, von Kenne S, Nolte N, Müller AJ, Schraven B, Görtler MW, Reymann KG, Gunzer M, Riek-Burchardt M. "Beware the intruder: Real time observation of infiltrated neutrophils and neutrophil-Microglia interaction during stroke in vivo." *PLoS One*, 2018; 13(3):e0193970.
- Nolte-t Hoen EN, Buschow SI, Anderton SM, Stoorvogel W, Wauben MH. "Activated T cells recruit exosomes secreted by dendritic cells via LFA-1." *Blood*, 2009; 113(9):1977-81.
- Ogawa Y, Taketomi Y, Murakami M, Tsujimoto M, Yanoshita R. "Small RNA transcriptomes of two types of exosomes in human whole saliva determined by next generation sequencing." *Biol Pharm Bull.*, 2013; 36(1):66-75.
- Onda T, Honmou O, Harada K, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD. "Therapeutic benefits by human mesenchymal stem cells (hMSCs) and Ang-1 gene-modified hMSCs after cerebral ischemia." *J Cereb Blood Flow Metab.*, 2008; 28(2):329-40.
- Ophelders DR, Wolfs T, Jellema RK, Zwanenburg A, Andriessen P, Delhaas T, Ludwig AK, Radtke S, Peters V, Janssen L, Giebel B, Kramer BW. "Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Protect the Fetal Brain After Hypoxia-Ischemia." *Stem Cells Transl Med.*, 2016; 5(6):754-63.
- Ormstad H, Aass HC, Lund-Sørensen N, Amthor KF, Sandvik L. "Serum levels of cytokines and C-reactive protein in acute ischemic stroke patients, and their relationship to stroke lateralization, type, and infarct volume." *J Neurol.* , 2011; 258(4):677-85.

- Otero-Ortega L, Laso-García F, Gómez-de Frutos MD, Rodríguez-Frutos B, Pascual-Guerra J, Fuentes B, Díez-Tejedor E, Gutiérrez-Fernández M. "White Matter Repair After Extracellular Vesicles Administration in an Experimental Animal Model of Subcortical Stroke." *Sci Rep.*, 2017: 7:44433.
- Paul, WE. "History of interleukin-4." *Cytokine*, 2015: 75(1):3-7.
- Pêche H, Heslan M, Usal C, Amigorena S, Cuturi MC. "Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection." *Transplantation*, 2003: 76(10):1503-10.
- Pelekanos RA, Sardesai VS, Futrega K, Lott WB, Kuhn M, Doran MR. "Isolation and Expansion of Mesenchymal Stem/Stromal Cells Derived from Human Placenta Tissue." *J Vis Exp.*, 2016: (112).
- Penforinis P, Pochampally R. "Isolation and expansion of mesenchymal stem cells/multipotential stromal cells from human bone marrow." *Methods Mol Biol.* , 2011: 698:11-21.
- Peng B, Guo QL, He ZJ, Ye Z, Yuan YJ, Wang N, Zhou J. "Remote ischemic postconditioning protects the brain from global cerebral ischemia/reperfusion injury by up-regulating endothelial nitric oxide synthase through the PI3K/Akt pathway." *Brain Res.*, 2012: 1445:92-102.
- Pettigrew LC, Kindy MS, Scheff S, Springer JE, Kryscio RJ, Li Y, Grass DS. "Focal cerebral ischemia in the TNFalpha-transgenic rat." *J Neuroinflammation.* , 2008: 5:47.
- Picascia A, Grimaldi V, Iannone C, Soricelli A, Napoli C. "Innate and adaptive immune response in stroke: Focus on epigenetic regulation." *J Neuroimmunol.* , 2015: 289:111-20.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science.* , 1999: 284(5411):143-7.
- Preda MB, Rønningen T, Burlacu A, Simionescu M, Moskaug JØ, Valen G. "Remote transplantation of mesenchymal stem cells protects the heart against ischemia-reperfusion injury." *Stem Cells*, 2014: 32(8):2123-34.
- Price C J, Menon D K, Peters A M, Ballinger J R, Barber R W, Balan K K, Lynch A, Xuereb J H, Fryer T, Guadagno J V, Warburton E A. "Cerebral neutrophil recruitment, histology, and outcome in acute ischemic stroke: an imaging-based study." *Stroke*, 2004: 35(7):1659-64.
- Prockop DJ, Sekiya I, Colter DC. "Isolation and characterization of rapidly self-renewing stem cells from cultures of human marrow stromal cells." *Cytotherapy*, 2001: 3(5):393-6.
- Qazi KR, Gehrman U, Domange Jordö E, Karlsson MC, Gabrielsson S. "Antigen-loaded exosomes alone induce Th1-type memory through a B-cell-dependent mechanism." *Blood*, 2009: 113(12):2673-83.
- Qazi KR, Torregrosa Paredes P, Dahlberg B, Grunewald J, Eklund A, Gabrielsson S. "Proinflammatory exosomes in bronchoalveolar lavage fluid of patients with sarcoidosis." *Thorax*, 2010: 65(11):1016-24.
- Qiao C, Xu W, Zhu W, Hu J, Qian H, Yin Q, Jiang R, Yan Y, Mao F, Yang H, Wang X, Chen Y. "Human mesenchymal stem cells isolated from the umbilical cord." *Cell Biol Int.* , 2008: 32(1):8-15.
- Quinn K, Henriques M, Parker T, Slutsky AS, Zhang H. "Human neutrophil peptides: a novel potential mediator of inflammatory cardiovascular diseases." *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* , 2008: 295(5):H1817-24.
- Rabinovich GA, Alonso CR, Sotomayor CE, Durand S, Bocco JL, Riera CM. "Molecular mechanisms implicated in galectin-1-induced apoptosis: activation of the AP-1 transcription factor and downregulation of Bcl-2." *Cell Death Differ.*, 2000: 7(8):747-53.

- Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, Ottonello L, Pistoia V. "Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche." *Stem Cells*, 2008; 26(1):151-62.
- Rana S, Claas C, Kretz CC, Nazarenko I, Zoeller M. "Activation-induced internalization differs for the tetraspanins CD9 and Tspan8: Impact on tumor cell motility." *Int J Biochem Cell Biol.*, 2011; 43(1):106-19.
- Rani S, O'Brien K, Kelleher FC, Corcoran C, Germano S, Radomski MW, Crown J, O'Driscoll L. "Isolation of exosomes for subsequent mRNA, MicroRNA, and protein profiling." *Methods Mol Biol.*, 2011; 784:181-95.
- Rao KN, Brown MA. "Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease." *Ann N Y Acad Sci*, 2008; 1143:83-104.
- Raposo G, Stoorvogel W. "Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends." *J Cell Biol.*, 2013; 200(4):373-83.
- Rasmusson I, Ringdén O, Sundberg B, Le Blanc K. "Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells." *Transplantation*, 2003; 76(8):1208-13.
- Ren X, Akiyoshi K, Dziennis S, Vandembark A A, Herson P S, Hurn P D, Offner H. "Regulatory B cells limit CNS inflammation and neurologic deficits in murine experimental stroke." *J Neurosci.* , 2011; 31(23):8556-63.
- Rosen ED, MacDougald OA. "Adipocyte differentiation from the inside out." *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2006; 7(12):885-96.
- Rosito M, Lauro C, Chece G, Porzia A, Monaco L, Mainiero F, Catalano M, Limatola C, Trettel F. "Transmembrane chemokines CX3CL1 and CXCL16 drive interplay between neurons, microglia and astrocytes to counteract pMCAO and excitotoxic neuronal death." *Front Cell Neurosci.* , 2014; 8:193.
- Roy-O'Reilly M, McCullough LD. "Sex differences in stroke: the contribution of coagulation." *Exp Neurol.*, 2014; 259:16-27.
- Rozmyslowicz T, Majka M, Kijowski J, Murphy SL, Conover DO, Poncz M, Ratajczak J, Gaulton GN, Ratajczak MZ. "Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV." *AIDS*, 2003; 17(1):33-42.
- Ruppert KA, Nguyen TT, Prabhakara KS, Toledano Furman NE, Srivastava AK, Harting MT, Cox CS Jr, Olson SD. "Human Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Modify Microglial Response and Improve Clinical Outcomes in Experimental Spinal Cord Injury." *Sci Rep.*, 2018; 11;8(1):480.
- Ruscher K, Kuric E, Liu Y, Walter HL, Issazadeh-Navikas S, Englund E, Wieloch T. "Inhibition of CXCL12 signaling attenuates the postischemic immune response and improves functional recovery after stroke." *J Cereb Blood Flow Metab.* , 2013; 33(8):1225-34.
- Samai A A, Martin-Schild S. "Sex differences in predictors of ischemic stroke: current perspectives." *Vasc Health Risk Manag.*, 2015; 11:427-36.
- Sarkar A, Mitra S, Mehta S, Raices R, Wewers MD. "Monocyte derived microvesicles deliver a cell death message via encapsulated caspase-1." *PLoS One*, 2009; 4(9):e7140.
- Satpathy AT, Briseño CG, Lee JS, Ng D, Manieri NA, Kc W, Wu X, Thomas SR, Lee WL, Turkoz M, McDonald KG, Meredith MM, Song C, Guidos CJ, Newberry RD, Ouyang W, Murphy TL, Stappenbeck TS, Gommerman JL, Nussenzweig MC, Colonna M, Kopan R, Murphy KM. "Notch2-dependent classical dendritic cells orchestrate intestinal immunity to attaching-and-effacing bacterial pathogens." *Nat Immunol.*, 2013; 14(9):937-48.

- Savitz SI, Misra V, Kasam M, Juneja H, Cox CS Jr, Alderman S, Aisiku I, Kar S, Gee A, Grotta JC. "Intravenous autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic stroke." *Ann Neurol.*, 2011; 70(1):59-69.
- Scheibe F, Klein O, Klose J, Priller J. "Mesenchymal stromal cells rescue cortical neurons from apoptotic cell death in an in vitro model of cerebral ischemia." *Cell Mol Neurobiol.*, 2012a; 32(4):567-76.
- Scheibe F, Ladhoff J, Huck J, Grohmann M, Blazej K, Oersal A, Baeva N, Seifert M, Priller J. "Immune effects of mesenchymal stromal cells in experimental stroke." *J Cereb Blood Flow Metab.* , 2012b; 32(8):1578-88.
- Schneider AT, Kissela B, Woo D, Kleindorfer D, Alwell K, Miller R, Szaflarski J, Gebel J, Khoury J, Shukla R, Moomaw C, Pancioli A, Jauch E, Broderick J. "Ischemic stroke subtypes: a population-based study of incidence rates among blacks and whites." *Stroke*, 2004; 35(7):1552-6.
- Schoenborn JR, Wilson CB. "Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses." *Adv Immunol.* , 2007; 96:41-101.
- Schofield R. "The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell." *Blood Cells.*, 1978; 4(1-2):7-25.
- Seifert HA, Collier LA, Chapman CB, Benkovic SA, Willing AE, Pennypacker KR. "Pro-inflammatory interferon gamma signaling is directly associated with stroke induced neurodegeneration." *J Neuroimmune Pharmacol.*, 2014; 9(5):679-89.
- Selvaraj U M, Poinatte K, Torres V, Ortega S B, Stowe A M. "Heterogeneity of B Cell Functions in Stroke-Related Risk, Prevention, Injury, and Repair." *Neurotherapeutics*, 2016; 13(4):729-747.
- Semenov OV, Koestenbauer S, Riegel M, Zech N, Zimmermann R, Zisch AH, Malek A. "Multipotent mesenchymal stem cells from human placenta: critical parameters for isolation and maintenance of stemness after isolation." *Am J Obstet Gynecol.* , 2010; 202(2):193.
- Shen LH, Li Y, Chen J, Cui Y, Zhang C, Kapke A, Lu M, Savant-Bhonsale S, Chopp M. "One-year follow-up after bone marrow stromal cell treatment in middle-aged female rats with stroke." *Stroke*, 2007; 38(7):2150-6.
- Shen LH, Li Y, Chen J, Zhang J, Vanguri P, Borneman J, Chopp M. "Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increases axon-myelin remodeling after stroke." *Neuroscience*, 2006; 137(2):393-9.
- Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, Sugimori H, Nakagawa R, Takada I, Iwaki T, Okada Y, Iida M, Cua D J, Iwakura Y, Yoshimura A. "Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury." *Nat Med.* , 2009; 15(8):946-50.
- Shin JH, Park YM, Kim DH, Moon GJ, Bang OY, Ohn T, Kim HH. "Ischemic brain extract increases SDF-1 expression in astrocytes through the CXCR2/miR-223/miR-27b pathway." *Biochim Biophys Acta.* , 2014; 1839(9):826-36.
- Silva B, Sousa L, Miranda A, Vasconcelos A, Reis H, Barcelos L, Arantes R, Teixeira A, Rachid MA. "Memory deficit associated with increased brain proinflammatory cytokine levels and neurodegeneration in acute ischemic stroke." *Arq Neuropsiquiatr.*, 2015; 73(8):655-9.
- Skalnikova H, Motlik J, Gadher SJ, Kovarova H. "Mapping of the secretome of primary isolates of mammalian cells, stem cells and derived cell lines." *Proteomics*, 2011; 11(4):691-708.
- Smith CJ, Emsley HC, Gavin CM, Georgiou RF, Vail A, Barberan EM, del Zoppo GJ, Hallenbeck JM, Rothwell NJ, Hopkins SJ, Tyrrell PJ. "Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome." *BMC Neurol.* , 2004; 4:2.

- Sobowale OA, Parry-Jones AR, Smith CJ, Tyrrell PJ, Rothwell NJ, Allan SM. "Interleukin-1 in Stroke: From Bench to Bedside." *Stroke*, 2016: 47(8):2160-7.
- Sohni A, Verfaillie CM. "Mesenchymal stem cells migration homing and tracking." *Stem Cells Int.*, 2013: 2013:130763.
- Soriano SG, Amaravadi LS, Wang YF, Zhou H, Yu GX, Tonra JR, Fairchild-Huntress V, Fang Q, Dunmore JH, Huszar D, Pan Y. "Mice deficient in fractalkine are less susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury." *J Neuroimmunol.* , 2002: 125(1-2):59-65.
- Sorrells SF, Paredes MF, Cebrian-Silla A, Sandoval K, Qi D, Kelley KW, James D, Mayer S, Chang J, Auguste KI, Chang EF, Gutierrez AJ, Kriegstein AR, Mathern GW, Oldham MC, Huang EJ, Garcia-Verdugo JM, Yang Z, Alvarez-Buyll. "Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults." *Nature*, 2018: 555(7696):377-381.
- Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. "Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2." *Blood*, 2008: 111(3):1327-33.
- Spees JL, Lee RH, Gregory CA. "Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function." *Stem Cell Res Ther.*, 2016: 7(1):125.
- Spees JL, Olson SD, Whitney MJ, Prockop DJ. "Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006: 103(5):1283-8.
- Steinman RM, Idoyaga J. "Features of the dendritic cell lineage." *Immunol Rev.*, 2010: 234(1):5-17.
- Stock P, Brückner S, Winkler S, Dollinger MM, Christ B. "Human bone marrow mesenchymal stem cell-derived hepatocytes improve the mouse liver after acute acetaminophen intoxication by preventing progress of injury." *Int J Mol Sci.*, 2014: 15(4):7004-28.
- Strbian D, Karjalainen-Lindsberg ML, Tatlisumak T, Lindsberg PJ. "Cerebral mast cells regulate early ischemic brain swelling and neutrophil accumulation." *J Cereb Blood Flow Metab.* , 2006: 26(5):605-12.
- Strecker JK, Minnerup J, Schütte-Nütgen K, Gess B, Schäbitz WR, Schilling M. "Monocyte chemoattractant protein-1-deficiency results in altered blood-brain barrier breakdown after experimental stroke." *Stroke*, 2013: 44(9):2536-44.
- Suárez-Monteagudo C, Hernández-Ramírez P, Alvarez-González L, García-Maeso I, de la Cuétara-Bernal K, Castillo-Díaz L, Bringas-Vega ML, Martínez-Aching G, Morales-Chacón LM, Báez-Martín MM, Sánchez-Catasús C, Carballo-Barreda M, Rodríguez-Rojas R, Gómez-. "Autologous bone marrow stem cell neurotransplantation in stroke patients. An open study." *Restor Neurol Neurosci.*, 2009: 27(3):151-61.
- Subra C, Grand D, Laulagnier K, Stella A, Lambeau G, Paillasse M, De Medina P, Monsarrat B, Perret B, Silvente-Poirot S, Poirot M, Record M. "Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins." *J Lipid Res.*, 2010: 51(8):2105-20.
- Subra C, Laulagnier K, Perret B, Record M. "Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies." *Biochimie*, 2007: 89(2):205-12.
- Sun G, Li G, Li D, Huang W, Zhang R, Zhang H, Duan Y, Wang B. "hucMSC derived exosomes promote functional recovery in spinal cord injury mice via attenuating inflammation." *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*, 2018: 89:194-204.
- Suzuki S, Tanaka K, Nogawa S, Nagata E, Ito D, Dembo T, Fukuuchi Y. "Temporal profile and cellular localization of interleukin-6 protein after focal cerebral ischemia in rats." *J Cereb Blood Flow Metab.* , 1999: 19(11):1256-62.
- Szatanek R, Baran J, Siedlar M, Baj-Krzyworzeka M. "Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach (Review)." *Int J Mol Med.*, 2015: 36(1):11-7.

- Taylor DD, Akyol S, Gercel-Taylor C. "Pregnancy-associated exosomes and their modulation of T cell signaling." *J Immunol.*, 2006: 176(3):1534-42.
- Temchura VV, Tenbusch M, Nchinda G, Nabi G, Tippler B, Zelenyuk M, Wildner O, Uberla K, Kuate S. "Enhancement of immunostimulatory properties of exosomal vaccines by incorporation of fusion-competent G protein of vesicular stomatitis virus." *Vaccine*, 2008: 26(29-30):3662-72.
- Terao Y, Ohta H, Oda A, Nakagaito Y, Kiyota Y, Shintani Y. "Macrophage inflammatory protein-3alpha plays a key role in the inflammatory cascade in rat focal cerebral ischemia." *Neurosci Res.*, 2009: 64(1):75-82.
- Tetta C, Bruno S, Fonsato V, Deregibus MC, Camussi G. "The role of microvesicles in tissue repair." *Organogenesis*, 2011: 7(2):105-15.
- Théry C, Duban L, Segura E, Véron P, Lantz O, Amigorena S. "Indirect activation of naïve CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes." *Nat Immunol.*, 2002: 3(12):1156-62.
- Théry C, Ostrowski M, Segura E. "Membrane vesicles as conveyors of immune responses." *Nat Rev Immunol.*, 2009: 9(8):581-93.
- Tian T, Wang Y, Wang H, Zhu Z, Xiao Z. "Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy." *J Cell Biochem.*, 2010: 111(2):488-96.
- Tian T, Zhu YL, Hu FH, Wang YY, Huang NP, Xiao ZD. "Dynamics of exosome internalization and trafficking." *J Cell Physiol.*, 2013: 228(7):1487-95.
- Tomasoni S, Longaretti L, Rota C, Morigi M, Conti S, Gotti E, Capelli C, Introna M, Remuzzi G, Benigni A. "Transfer of growth factor receptor mRNA via exosomes unravels the regenerative effect of mesenchymal stem cells." *Stem Cells Dev.*, 2013: 22(5):772-80.
- Toyoshima A, Yasuhara T, Kameda M, Morimoto J, Takeuchi H, Wang F, Sasaki T, Sasada S, Shinko A, Wakamori T, Okazaki M, Kondo A, Agari T, Borlongan CV, Date I. "Intra-Arterial Transplantation of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Mounts Neuroprotective Effects in a Transient Ischemic Stroke Model in Rats: Analyses of Therapeutic Time Window and Its Mechanisms." *PLoS One*, 2015: 10(6):e0127302.
- Traggiati E, Volpi S, Schena F, Gattorno M, Ferlito F, Moretta L, Martini A. "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients." *Stem Cells*, 2008: 26(2):562-9.
- Turturici G, Tinnirello R, Sconzo G, Geraci F. "Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication: advantages and disadvantages." *Am J Physiol Cell Physiol.*, 2014: 306(7):C621-33.
- Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. "Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective." *Biosci Rep.*, 2015: 35(2).
- Urbanelli L, Buratta S, Sagini K, Ferrara G, Lanni M, Emiliani C. "Exosome-based strategies for Diagnosis and Therapy." *Recent Pat CNS Drug Discov.*, 2015: 10(1):10-27.
- Vallabhaneni KC, Penfornis P, Dhule S, Guillonneau F, Adams KV, Mo YY, Xu R, Liu Y, Watabe K, Vemuri MC, Pochampally R. "Extracellular vesicles from bone marrow mesenchymal stem/stromal cells transport tumor regulatory microRNA, proteins, and metabolites." *Oncotarget.*, 2015: 6(7):4953-67.
- Van Camp JK, Beckers S, Zegers D, Van Hul W. "Wnt signaling and the control of human stem cell fate." *Stem Cell Rev.*, 2014: 10(2):207-29.
- van den Akker F, de Jager SC, Sluijter JP. "Mesenchymal stem cell therapy for cardiac inflammation: immunomodulatory properties and the influence of toll-like receptors." *Mediators Inflamm.*, 2013: 2013:181020.

- van Velthoven CT, Sheldon RA, Kavelaars A, Derugin N, Vexler ZS, Willemen HL, Maas M, Heijnen CJ, Ferriero DM. "Mesenchymal stem cell transplantation attenuates brain injury after neonatal stroke." *Stroke*, 2013; 44(5):1426-32.
- Vasaghi A, Dehghani A, Khademalhosseini Z, Khosravi Maharlooei M, Monabati A, Attar A. "Parameters that influence the isolation of multipotent mesenchymal stromal cells from human umbilical cord blood." *Hematol Oncol Stem Cell Ther.*, 2013; 6(1):1-8.
- Verderio C, Muzio L, Turola E, Bergami A, Novellino L, Ruffini F, Riganti L, Corradini I, Francolini M, Garzetti L, Maiorino C, Servida F, Vercelli A, Rocca M, Dalla Libera D, Martinelli V, Comi G, Martino G, Matteoli M, Furlan R. "Myeloid microvesicles are a marker and therapeutic target for neuroinflammation." *Ann Neurol.*, 2012; 72(4):610-24.
- Viaud S, Terme M, Flament C, Taieb J, André F, Novault S, Escudier B, Robert C, Caillat-Zucman S, Tursz T, Zitvogel L, Chaput N. "Dendritic cell-derived exosomes promote natural killer cell activation and proliferation: a role for NKG2D ligands and IL-15 α ." *PLoS One*, 2009; 4(3):e4942.
- Vila N, Castillo J, Dávalos A, Esteve A, Planas AM, Chamorro A. "Levels of anti-inflammatory cytokines and neurological worsening in acute ischemic stroke." *Stroke*, 2003; 34(3):671-5.
- Wagner W, Ho AD. "Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges." *Stem Cell Rev.*, 2007; 3(4):239-48.
- Walczak P, Zhang J, Gilad AA, Kedziorek DA, Ruiz-Cabello J, Young RG, Pittenger MF, van Zijl PC, Huang J, Bulte JW. "Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia." *Stroke*, 2008; 39(5):1569-74.
- Wan Y Y. "Multi-tasking of helper T cells." *Immunology*, 2010; 130(2):166-71.
- Wang G, Dinkins M, He Q, Zhu G, Poirier C, Campbell A, Mayer-Proschel M, Bieberich E. "Astrocytes secrete exosomes enriched with proapoptotic ceramide and prostate apoptosis response 4 (PAR-4): potential mechanism of apoptosis induction in Alzheimer disease (AD)." *J Biol Chem.*, 2012; 287(25):21384-95.
- Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. "Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord." *Stem Cells*, 2004; 22(7):1330-7.
- Wang L, Li Y, Chen X, Chen J, Gautam SC, Xu Y, Chopp M. "MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture." *Hematology*, 2002; 7(2):113-7.
- Wang SS, Hu SW, Zhang QH, Xia AX, Jiang ZX, Chen XM. "Mesenchymal Stem Cells Stabilize Atherosclerotic Vulnerable Plaque by Anti-Inflammatory Properties." *PLoS One*, 2015; 10(8):e0136026.
- Wang Y, Qin ZH. "Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death." *Apoptosis*, 2010; 15(11):1382-402.
- Wang Y, Yu X, Chen E, Li L. "Liver-derived human mesenchymal stem cells: a novel therapeutic source for liver diseases." *Stem Cell Res Ther.*, 2016; 7(1):71.
- Wang Y, Zhang A, Ye Z, Xie H, Zheng S. "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibit acute rejection of rat liver allografts in association with regulatory T-cell expansion." *Transplant Proc.*, 2009; 41(10):4352-6.
- Wei N, Yu SP, Gu X, Taylor TM, Song D, Liu XF, Wei L. "Delayed intranasal delivery of hypoxic-preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells enhanced cell homing and therapeutic benefits after ischemic stroke in mice." *Cell Transplant.*, 2013; 22(6):977-91.
- Wei ZZ, Gu X, Ferdinand A, Lee JH, Ji X, Ji XM, Yu SP, Wei L. "Intranasal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells improved neurovascular regeneration and rescued neuropsychiatric deficits after neonatal stroke in rats." *Cell Transplant.*, 2015; 24(3):391-402.

- Whitney NP, Eidem TM, Peng H, Huang Y, Zheng JC. "Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders." *J Neurochem.*, 2009; 108(6):1343-59.
- Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Théry C, Masurier C, Flament C, Pouzieux S, Faure F, Tursz T, Angevin E, Amigorena S, Zitvogel L. "Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming." *Nat Med.*, 2001; 7(3):297-303.
- Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. "Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis." *Stem Cells*, 2007; 25(10):2648-59.
- Xin H, Chopp M, Shen LH, Zhang RL, Zhang L, Zhang ZG, Li Y. "Multipotent mesenchymal stromal cells decrease transforming growth factor β 1 expression in microglia/macrophages and down-regulate plasminogen activator inhibitor 1 expression in astrocytes after stroke." *Neurosci Lett.*, 2013c; 10;542:81-6.
- Xin H, Katakowski M, Wang F, Qian JY, Liu XS, Ali MM, Buller B, Zhang ZG, Chopp M. "MicroRNA cluster miR-17-92 Cluster in Exosomes Enhance Neuroplasticity and Functional Recovery After Stroke in Rats." *Stroke*, 2017a; 48(3):747-753.
- Xin H, Li Y, Buller B, Katakowski M, Zhang Y, Wang X, Shang X, Zhang ZG, Chopp M. "Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth." *Stem Cells*, 2012; 30(7):1556-64.
- Xin H, Li Y, Liu Z, Wang X, Shang X, Cui Y, Zhang ZG, Chopp M. "MiR-133b promotes neural plasticity and functional recovery after treatment of stroke with multipotent mesenchymal stromal cells in rats via transfer of exosome-enriched extracellular particles." *Stem Cells*, 2013a; 31(12):2737-46.
- Xin H, Li Y, Cui Y, Yang JJ, Zhang ZG, Chopp M. "Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats." *J Cereb Blood Flow Metab.*, 2013b; 33(11):1711-5.
- Xin H, Wang F, Li Y, Lu QE, Cheung WL, Zhang Y, Zhang ZG, Chopp M. "Secondary Release of Exosomes From Astrocytes Contributes to the Increase in Neural Plasticity and Improvement of Functional Recovery After Stroke in Rats Treated With Exosomes Harvested From MicroRNA 133b-Overexpressing Multipotent Mesenchymal Stromal Ce." *Cell Transplant.*, 2017b; 26(2):243-257.
- Xu W, Zhang X, Qian H, Zhu W, Sun X, Hu J, Zhou H, Chen Y. "Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro." *Exp Biol Med (Maywood)*, 2004; 229(7):623-31.
- Yan J, Greer JM, McCombe PA. "Prolonged elevation of cytokine levels after human acute ischaemic stroke with evidence of individual variability." *J Neuroimmunol.*, 2012; 246(1-2):78-84.
- Yang I, Han SJ, Kaur G, Crane C, Parsa AT. "The role of microglia in central nervous system immunity and glioma immunology." *J Clin Neurosci.*, 2010a; 17(1):6-10.
- Yang X, Meng S, Jiang H, Chen T, Wu W. "Exosomes derived from interleukin-10-treated dendritic cells can inhibit trinitrobenzene sulfonic acid-induced rat colitis." *Scand J Gastroenterol.*, 2010b; 45(10):1168-77.
- Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. "Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat." *J Cereb Blood Flow Metab.*, 2007; 27(4):697-709.
- Yasuhara T, Matsukawa N, Hara K, Maki M, Ali MM, Yu SJ, Bae E, Yu G, Xu L, McGrogan M, Bankiewicz K, Case C, Borlongan CV. "Notch-induced rat and human bone marrow stromal cell grafts reduce ischemic cell loss and ameliorate behavioral deficits in chronic stroke animals." *Stem Cells Dev.*, 2009; 18(10):1501-14.

- Yilmaz G, Granger DN. "Leukocyte recruitment and ischemic brain injury." *Neuromolecular Med.*, 2010: 12(2):193-204.
- Yoo SW, Chang DY, Lee HS, Kim GH, Park JS, Ryu BY, Joe EH, Lee YD, Kim SS, Suh-Kim H. "Immune following suppression mesenchymal stem cell transplantation in the ischemic brain is mediated by TGF- β ." *Neurobiol Dis.*, 2013: 58:249-57.
- Yoon YJ, Kim OY, Gho YS. "Extracellular vesicles as emerging intercellular comunicasomes." *BMB Rep.*, 2014: 47(10):531-9.
- Yuyama K, Sun H, Sakai S, Mitsutake S, Okada M, Tahara H, Furukawa J, Fujitani N, Shinohara Y, Igarashi Y. "Decreased amyloid- β pathologies by intracerebral loading of glycosphingolipid-enriched exosomes in Alzheimer model mice." *J Biol Chem.*, 2014: 289(35):24488-98.
- Zaremba J, Losy J. "Early TNF-alpha levels correlate with ischaemic stroke severity." *Acta Neurol Scand.*, 2001: 104(5):288-95.
- Zhang B, Liu R, Shi D, Liu X, Chen Y, Dou X, Zhu X, Lu C, Liang W, Liao L, Zenke M, Zhao RC. "Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2-dependent regulatory dendritic cell population." *Blood*, 2009: 113(1):46-57.
- Zhang HG, Liu C, Su K, Yu S, Zhang L, Zhang S, Wang J, Cao X, Grizzle W, Kimberly RP. "A membrane form of TNF-alpha presented by exosomes delays T cell activation-induced cell death." *J Immunol.*, 2006: 176(12):7385-93.
- Zhang J, Li S, Li L, Li M, Guo C, Yao J, Mi S. "Exosome and exosomal microRNA: trafficking, sorting, and function." *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2015a: 13(1):17-24.
- Zhang L, Yi L, Chopp M, Kramer BC, Romanko M, Gosiewska A, Hong K. "Intravenous administration of human umbilical tissue-derived cells improves neurological function in aged rats after embolic stroke." *Cell Transplant.*, 2013: 22(9):1569-76.
- Zhang LL, Zhang HT, Cai YQ, Han YJ, Yao F, Yuan ZH, Wu BY. "Anti-inflammatory Effect of Mesenchymal Stromal Cell Transplantation and Quercetin Treatment in a Rat Model of Experimental Cerebral Ischemia." *Cell Mol Neurobiol.*, 2016: 36(7):1023-34.
- Zhang Y, Chopp M, Liu XS, Katakowski M, Wang X, Tian X, Wu D, Zhang ZG. "Exosomes Derived from Mesenchymal Stromal Cells Promote Axonal Growth of Cortical Neurons." *Mol Neurobiol.*, 2017: 54(4):2659-2673.
- Zhang Y, Chopp M, Meng Y, Katakowski M, Xin H, Mahmood A, Xiong Y. "Effect of exosomes derived from multipuripotent mesenchymal stromal cells on functional recovery and neurovascular plasticity in rats after traumatic brain injury." *J Neurosurg.*, 2015b: 122(4):856-67.
- Zhang Y, Gao Z, Wang D, Zhang T, Sun B, Mu L, Wang J, Liu Y, Kong Q, Liu X, Zhang Y, Zhang H, He J, Li H1, Wang G. "Accumulation of natural killer cells in ischemic brain tissues and the chemotactic effect of IP-10." *J Neuroinflammation.*, 2014: 11:79.
- Zhao BQ, Wang S, Kim HY, Storrie H, Rosen BR, Mooney DJ, Wang X, Lo EH. "Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke." *Nat Med.*, 2006: 12(4):441-5.
- Zhao JJ, Liu JL, Liu L, Jia HY. "Protection of mesenchymal stem cells on acute kidney injury." *Mol Med Rep.*, 2014: 9(1):91-6.
- Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. "Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats." *Exp Neurol.*, 2002: 174(1):11-20.
- Zhao X, Wang H, Sun G, Zhang J, Edwards NJ, Aronowski J. "Neuronal Interleukin-4 as a Modulator of Microglial Pathways and Ischemic Brain Damage." *J Neurosci.*, 2015: 35(32):11281-91.

- Zhao ZG, Cao Z, Xu W, Sun L, You Y, Li F, Li QB, Zou P. "Immune protection function of multipotent mesenchymal stromal cells: role of transforming growth factor- β 1." *Cancer Invest.*, 2012; 30(9):646-56.
- Zhu H, Yang A, Du J, Li D, Liu M, Ding F, Gu X, Liu Y. "Basic fibroblast growth factor is a key factor that induces bone marrow mesenchymal stem cells towards cells with Schwann cell phenotype." *Neurosci Lett.*, 2014; 559:82-7.
- Zimmerlin L, Park TS, Zambidis ET, Donnenberg VS, Donnenberg AD. "Mesenchymal stem cell secretome and regenerative therapy after cancer." *Biochimie*, 2013; 95(12):2235-45.