**Warszawa, 14.06.2017**

**Mgr inż. Patrycja Obtułowicz**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem

**Prof. dr hab. n. med. Krystyny Domańskiej-Janik**

Promotor pomocniczy

 **dr Anna Sarnowska**

**Właściwości naczynio- i neuro-protekcyjne komórek mezenchymalnych oraz progenitorów endotelialnych pochodzących z galarety Whartona**

**Streszczenie**

Udar mózgu jest drugim głównym powodem śmierci na świecie i najczęstszą przyczyną niesprawności w populacji osób w średnim i podeszłym wieku [1]. W 85% spowodowany jest zatrzymaniem dopływu krwi do mózgu (udar niedokrwienny), natomiast w 15% uszkodzeniem naczyń i wylewem krwi do otaczającej tkanki (udar krwotoczny) [2]–[4]. W wyniku niedokrwiennego uszkodzenia mózgu dochodzi do gwałtownego zaburzenia homeostazy tkanki, skutkującego nieprawidłowościami w przekaźnictwie sygnałów w obrębie postulowanej obecnie jednostki neuronaczyniowej (ang. Neuro Vascular Unit, NVU) [5]. Całokształt patologicznych reakcji zachodzących podczas niedokrwienia mózgu jest określany mianem triady naczynio-neuralno-zapalnej. Składa się na nią: miejscowe ograniczenie przepływu krwi, rozszczelnienie bariery krew mózg, infiltracja komórek i sekrecja cytokin prozapalnych w obrębie i okolicy martwiczego ogniska udarowego z aktywacją astrocytów i mikrogleju oraz śmiercią neuronów [6], [7].

Obecnie w terapii udaru niedokrwiennego mózgu złotym standardem jest leczenie trombolityczne z zastosowaniem rekombinowanego tkankowego aktywatora plazminogenu (rt-PA, ateplaza). We wtórnej profilaktyce stosuje się leczenie przeciwpłytkowe kwasem acetylosalicylowym. Niestety aby pacjent kwalifikował się do leczenia rt-PA musi spełniać restrykcyjne kryteria włączenia oraz zmieścić się w dość wąskim oknie terapeutycznym, wynoszącym 4,5 godziny od wystąpienia pierwszych objawów. Niezależnie od zastosowanego leczenia pacjenci przeważnie odczuwają skutki przebytego udaru i wymagają długotrwałej rehabilitacji. Ze względu na złożony mechanizm uszkodzenia ischemicznego, istnieje silna potrzeba znalezienia terapii o szerokim spektrum działania. Pomimo licznych badań, wciąż nie znaleziono leku o wystarczającej efektywności terapeutycznej. Dużym wyzwaniem jest również regeneracja uszkodzonego mózgu, szczególnie u pacjentów
z utrwalonym deficytem neurologicznym.

Wszechstronne właściwości komórek mezenchymalnych czynią je doskonałym kandydatem do zastosowania w nowoczesnej medycynie regeneracyjnej. Komórki te są łatwe w pozyskaniu, bezpieczne oraz nie budzą kontrowersji etycznych. Jednymi z najistotniejszych cech mezenchymalnych komórek macierzystych w aspekcie odbudowy mózgu po niedokrwieniu są m. in.: potencjał do różnicowania w inne typy komórek, zarówno wywodzących się z mezodermy jak i neuro-ektodermy i zdolność do wydzielania licznych cytokin, w tym immunomodulujących, antyapoptotycznych, angiogennych i neurogennych. Ponadto komórki mezenchymalne są prawdopodobnie zdolne do formowania połączeń między niszami neurogennymi a miejscem uszkodzenia mózgu, przyczyniając się w ten sposób do stymulacji regeneracji. Niestety prowadzone do tej pory badania kliniczne wykazały umiarkowane i stosunkowo niespójne korzyści wynikające
z terapii komórkowej, wskazując na konieczność zwiększenia efektywności terapeutycznej komórek [8], [9].

W zależności od zamierzonych celów właściwości regeneracyjne komórek można zwiększać na różnorakie sposoby. W prezentowanej pracy wykorzystano zdolność komórek mezenchymalnych do przechodzenia w stan immunomodulacyjny (fenotyp MS2) lub prozapalny (fenotyp MS1) poprzez stymulację odpowiednich receptorów Toll podobnych oraz potencjał do różnicowania w kierunku progenitorów śródbłonkowych, które prawdopodobnie odgrywają istotną rolę w regeneracji uszkodzonego mózgu [10], [11].

W prezentowanej pracy badano właściwości komórek mezenchymalnych pochodzących
z galarety Whartona (WJ-MSC) oraz ich zdolność do indukowanego różnicowania się w kierunku progenitorów śródbłonkowych WJ-EPC. Komórki MSC pozyskuje się w łatwy i nieinwazyjny sposób ze sznura pępowiny, pobranego bezpośrednio po porodzie. Poza typowymi dla komórek mezenchymalnych właściwościami, WJ-MSC cechują się szybszą proliferacją, niską immunogennością oraz pro-neuralnym charakterem sekrecji i różnicowania [12], [13]. Co więcej w badaniach Jui-Yu Hsieh (2013) i w naszej grupie [12] wykazano, że w porównaniu do komórek pochodzących ze szpiku kostnego, komórki wyizolowane z galarety Whartona wydzielają więcej czynników związanych
z działaniem neuroprotekcyjnym, neuro- i angiogennym oraz, dzięki swoim właściwościom parakrynnym, intensywniej stymulują różnicowanie i migrację endogennych komórek neuralnych. WJ-MSC wybiórczo stymulują wzrost neuronów i wykazują działanie antyapoptotyczne w pierwotnej hodowli komórek korowych w modelu czasowego pozbawienia glukozy i tlenu (ang. oxygen glucose deprivation, OGD). Komórki te również efektywniej indukują formowanie drobnych naczyń krwionośnych oraz migrację komórek we współhodowli z komórkami śródbłonkowymi [14].

W trakcie udaru niedokrwiennego, poza komórkami nerwowymi zostają uszkodzone również komórki śródbłonka naczyń krwionośnych. Ostatnie badania donoszą, że MSC pochodzące z galarety Whartona mają zdolność do różnicowania się in vitro m. in. w progenitory śródbłonkowe (WJ-EPC), które mogą odgrywać zasadniczą rolę w regeneracji uszkodzonych mikronaczyń i przywróceniu prawidłowego funkcjonowania jednostki neuronaczyniowej po podaniu domózgowym w udarze niedokrwiennym [15]. W szeregu badań wykazano, że progenitorowe komórki śródbłonkowe stymulują neowaskularyzację penumbry [16]–[18], a ich duża liczba w krwi obwodowej koreluje
z pozytywnym przebiegiem klinicznym [26], [27]. Ponadto komórki śródbłonkowe cechują się wysoką sekrecją szeregu czynników wzrostowych i cytokin stymulujących proliferację, migrację i tworzenie struktur kapilaropodobnych [19], jakich jak: VEGF-A, B [20], TGF-B1 [15], [21], IL-6 [22], [23], czy IL-10 [24]–[26]. W innych badaniach wykazano, że wzbogacenie hodowli komórek śródbłonkowych (HUVEC) uszkodzonych przez stres oksydacyjny (H2O2), pożywką zebraną z hodowli progenitorów śródbłonkowych, ma działanie antyapoptotyczne i chroni ją przed utratą właściwości naczyniotwórczych [27]. Poza właściwościami angiogennymi coraz częściej wskazuje się na właściwości neurogenne i neuroprotekcyjne progenitorów śródbłonkowych, co podkreśla istotność współdziałania tych elementów w ramach jednostki NVU[28].

Wszystkie te dane zainspirowały badania, które stały się przedmiotem prezentowanej rozprawy doktorskiej. Postawiono pytanie czy komórki o profilu mezenchymalnym wyizolowane
z galarety Whartona (WJ-MSC) mogą in vitro wytworzyć fenotyp o cechach klasycznych progenitorów śródbłonkowych (WJ-EPC) o zwiększonych/rozszerzonych właściwościach protekcyjnych w stosunku do zmian poniedokrwiennych w mózgu.

Istotnym problemem związanym z terapią komórkową jest stosunkowo krótka przeżywalność nawet autologicznego przeszczepu w organizmie biorcy. Celem mojej pracy było również zbadanie czy istnieje możliwość przedłużenia żywotności i funkcji regeneracyjnej transplantu domózgowego komórek, między innymi poprzez optymalizację czasu wykonania przeszczepu, zahamowanie lub modyfikację odpowiedzi immunologicznej czy epi/genetycznej przeszczepianych komórek terapeutycznych. Obecnie jedną z najbardziej obiecujących metod wydłużania żywotności komórek jest przeszczepianie ich pod postacią agregatu 3D [29]. Idealne rusztowanie, poza ochronnym
i cytomimetycznym wpływem na przeszczepiane komórki, powinno wywoływać również pozytywne efekty regeneracyjne w otaczającej tkance biorcy. Biorąc pod uwagę dane literaturowe
i poprzednie wyniki doświadczeń prowadzonych przez naszą grupę, wymogi te mógłby spełniać lizat płytkowy. W poprzednich badaniach przeprowadzonych przez Yael Hayon (2012 i 2013), wykazano że lizat płytkowy podany do komór bocznych mózgu po trwałej okluzji tętnicy środkowej mózgu szczura, działa neuro- i angio-gennie zarówno w strefie okołokomorowej jak i bezpośrednio w miejscu uszkodzenia [30], [31]. Ponadto stwierdzono poprawę funkcji motorycznych po padaniu lizatu,
a wielkość uszkodzenia ulegała zmniejszeniu sugerując całościowe działanie neuroprotekcyjne.
W innej pracy tej samej grupy wykazano pozytywny wpływ lizatu płytkowego na proliferacje, przeżywalność i różnicowanie neuralnych komórek macierzystych [32]. Co najistotniejsze lizat ten
w obecności trombiny wytwarza trójwymiarową sieć [33], która może służyć za rusztowanie (skafold) dla podawanych domózgowo komórek regeneracyjnych.

Poza powyżej opisanymi głównymi celami, w prezentowanej pracy możemy wyróżnić cele pośrednie dotyczące :

 - oceny potencjału hodowli komórek mezenchymalnych pochodzących z galarety Whartona (WJ-MSC) do indukowanego różnicowania się w kierunku śródbłonkowym (WJ-EPC);

 - porównania wpływu WJ-MSC i WJ-EPC na powstawanie sieci naczyniowej oraz żywotność neuronów CA1 (wyjątkowo wrażliwych na ischemię) w organotypowym modelu hodowli skrawków hipokampa (OHC) po czasowym pozbawieniu glukozy i tlenu (OGD);

 - oceny ekspresji immunomodulujących receptorów Toll-podobnych (TLR3 i TLR4)
w warunkach kontrolnych i po stymulacji czynnikami immunomodulującymi oraz ich wpływu na sekretom komórek WJ-MSC i WJ-EPC;

 - charakterystyki porównawczej oddziaływania WJ-MSC i WJ-EPC na sieć naczyniową, odpowiedź zapalną i tworzenie blizny glejowej w warunkach ich transplantacji domózgowej
w eksperymentalnym modelu ischemicznego uszkodzenia mózgu szczura.

Badania zostały omówione w trzech podrozdziałach, zgodnie z ich przeprowadzeniem
w warunkach 1) *in vitro, 2) ex vivo i 3) in vivo.*

1. W pierwszym etapie doświadczeń oceniono zdolność komórek WJ-MSC do różnicowania
w kierunku śródbłonkowym w warunkach hodowli prowadzonej w obniżonym 5% stężeniu tlenu. Charakterystykę fenotypową komórek przeprowadzono poprzez oznaczenie ekspresji specyficznych markerów komórkowych, takich jak: vWF, PECAM-1, VEGFR2, VEGF, VCAM-1, CD90, CD73, CD105 metodami immunocytochemii, cytometrii przepływowej oraz biologii molekularnej. Potencjał proliferacyjny WJ-MSC i WJ-EPC oceniano przy pomocy kolorymetrycznych pomiarów z użyciem odczynnika WST-1. Funkcjonalne potwierdzenie śródbłonkowego kierunku różnicowania oceniono
w hodowli prowadzonej na podłożu zawierającym białka macierzy zewnątrzkomórkowej (Extracellular Matrix, ECM) w obecności acetylowanej lipoproteiny o niskiej gęstości (Dil-Ac-LDL). Ocenę sekrecji wybranych cytokin i czynników wzrostowych: IL-6, TGFB-1 i VEGF, wykonano cytometrycznie przy użyciu zestawu CBA Flex Sets.

Komórki macierzyste wyizolowane z galarety Whartona w trakcie hodowli *in vitro* przyjmowały kształt podobny do fibroblastów, przylegały do podłoża oraz były zdolne do migracji. Charakterystyka fenotypowa tej frakcji wykazała typowe cechy komórek MSC. Otrzymane WJ-MSC posiadały silny potencjał do różnicowania w kierunku śródbłonkowym w warunkach obniżonego do 5% stężenia tlenu *in vitro* i zastosowaniu medium różnicującego EGM-2 (Lonza). Różnicowanie śródbłonkowe znacząco zwiększyło potencjał proliferacyjny komórek mezenchymalnych. Średni czas podwajania populacji WJ-EPC (0,79 dnia) był cztery razy krótszy w porównaniu do WJ-MSC hodowanych równolegle (4,06 dnia). Komórki stawały się owalne oraz trzykrotnie zmniejszały swoją wielkość w porównaniu do wyjściowych komórek o klasycznym fenotypie MSC. Zarówno WJ-MSC, jak i WJ-EPC reagowały z przeciwciałami dla VEGF-A, VEGFR- 2 oraz VCAM-1, ale tylko zróżnicowane śródbłonkowo komórki wykazywały ekspresję specyficznych markerów PECAM-1 oraz vWF. Niezależnie od stopnia zróżnicowania oba typy komórek były immunopozytywne w reakcji
z przeciwciałami dla markerów mezenchymalnych CD90, CD73 i CD105 oraz negatywne dla CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR. Komórki mezenchymalne pochodzące z galarety Whartona nabywały zdolności do tworzenia typowych dla śródbłonka struktur (pętli) kapilaropodobnych już po 4 dniach inkubacji w medium indukującym (EGM-2), jednak tworzone sieci zwiększały wydatnie swoją trwałość oraz średnice pętli aż do 7 dnia różnicowania. Czas wytwarzania pierwszych sieci kapikaropodobnych po wysianiu komórek EPC na Matrigel wynosił 2 godziny, natomiast największą liczbę pętli i połączeń między nimi można było zaobserwować po 7 godzinach hodowli. Funkcjonalnie, WJ-EPC wychwytywały DiL-AC-LDL już po 4 godzinach inkubacji, co jest jedną ze specyficznych cech fagocytujących makrofagów i komórek śródbłonkowych.

W celu poznania mechanizmów neuro- i naczynio-protekcyjnych badanych komórek mezenchymalnych sprawdzono w nich poziom sekrecji następujących czynników: przeciwzapalnego TGF-B1, immunomodulacyjnej IL-6 oraz naczynio-neuroprotekcyjnego VEGF. Stwierdzono znamiennie wyższą sekrecję czynników TGF-B1 i IL-6 przez komórki zróżnicowane do fenotypu EPC oraz brak wykrywalnych ilości wydzielanych interleukin IL-2 i IL-10 przez oba badane typy komórek. Sekrecja VEGF utrzymywała się na stabilnym, stosunkowo wysokim i porównywalnym poziomie zarówno
w WJ-MSC jak i WJ-EPC. Stosując polecane w literaturze stężenia agonistów receptorów TLR3 i TLR4 (Poly(I:C) i LPS), zbadano ich wpływ na sekrecję badanych czynników przez oba typy komórek.
W hodowli WJ-EPC zaobserwowano stymulację wydzielania TGF-B1 oraz IL-6 pod wpływem poly(I:C)
i LPS (ligandów TLR3/4) przy spadku sekrecji VEGF w wyższych stężeniach tych agonistów.
W równoległym doświadczeniu określono poziom ekspresji badanych czynników immunomodulujących i receptorów TLR w hodowli WJ-EPC i WJ-MSC. Oba typy komórek wykazywały stosunkowo niski poziom ekspresji zarówno receptorów Toll-podobnych TLR3 i TLR4 jak i czynników oraz cytokin sekrecyjnych TGF-B1, VEGF i IL-6, w porównaniu do BM-MSC, co można tłumaczyć niepełną dojrzałością układu immunologicznego komórek WJ o pochodzeniu płodowym.

1. Badania naczynio- i neuroprotekcyjnego działania badanych komórek mezenchymalnych przeprowadzono w modelu niedokrwienia *ex vivo,* wywołanym czasowym pozbawieniem organotypowych skrawków hipokampa szczura (OHC) glukozy i tlenu (OGD). Stwierdzono wybiórcze uszkodzenie neuronów piramidowych w regionie CA1, przy zachowaniu niezmiennej struktury
w regionie CA2/3. Wpływ WJ-MSC i WJ-EPC współhodowanych ze skrawkami hipokampa oceniano odpowiednio metodą barwienia immunocytochemicznego z zastosowaniem specyficznego dla śródbłonka szczura przeciwciała RECA-1 oraz poprzez przyżyciowe barwienie histochemiczne martwych komórek jodkiem propidyny (IP).

 Klasyczna struktura naczyń krwionośnych szczura, oceniana na podstawie znakowania komórek śródbłonkowych przeciwciałem RECA-1 w organotypowych skrawkach hipokampa
w regionach CA1 i CA2/3, była prawidłowa i dobrze zachowana przez cały czas trwania eksperymentu. Natomiast w wyniku uszkodzenia OGD obserwowano istotny i wybiórczy zanik naczyń krwionośnych w regionie CA1. W rejonie CA2/3 gęstość naczyń krwionośnych utrzymywała się na stabilnym poziomie. Nie zaobserwowano istotnego wpływu współhodowli nieuszkodzonych skrawków hipokampa z komórkami WJ-EPC/WJ-MSC w badanych regionach CA1 i CA2/3 w czasie trwania tego eksperymentu. Natomiast pośrednia współhodowla zarówno WJ-MSC jak i WJ-EPC
z uszkodzonymi przez OGD skrawkami OHC znacząco hamowała atrofię naczyń krwionośnych
w regionie CA1 hipokampa. Nieznacznie lepsze, acz nieistotne statystycznie właściwości naczynioprotekcyjne wykazywały komórki WJ-EPC (odpowiednio 1,5 i 1,4-razy większa gęstość naczyń krwionośnych w regionie CA1 we współhodowli z WJ-EPC i WJ-MSC). Śmierć komórek
w organotypowych skrawkach hipokampa oceniana przyrostem liczby martwych komórek znakowanych jodkiem propidyny po poddaniu ich procedurze pozbawienia glukozy i tlenu (OGD), występowała selektywnie w regionie CA1. W wyniku współhodowli uszkodzonych skrawków zarówno z WJ-MSC jak i WJ-EPC, znacząco zmniejszyła się śmiertelność komórek tego regionu. Przyjmując umownie, że śmiertelność w CA1 po OGD wynosiła 100%, we współhodowli z komórkami WJ-MSC
i WJ-EPC spadła ona do kolejno 75% oraz 59%.

3) Badania naczynio- i neuroprotekcyjnej funkcji przeszczepu komórek WJ MSC i WJ EPC *in vivo* przeprowadzono na dorosłych (3 miesięcznych) szczurach szczepu Wistar (samce), według poniższego schematu (Ryc. 34):

WJ-MSC / WJ-EPC

Pobranie materiału

OUA

**-3**

**21**

**14**

**7**

**0**

Dni w stosunku do wykonania przeszczepu WJ-MSC/WJ-EPC

**Ryc. 34.** Schemat przeprowadzanych doświadczeń *in vivo* (OUA- uszkodzenie mózgu szczura ouabainą; WJ-MSC/WJ-EPC – przeszczep komórek).

Jednostronne ogniskowe uszkodzenie mózgu (OUA) wykonano poprzez podanie ouabainy do okolicy prążkowia mózgu szczura wg metody stosowanej od lat w naszej pracowni [34]. Efekty protekcyjne miejscowego przeszczepu WJ-MSC i WJ-EPC oceniano w tym modelu w okolicy lezji korowo/prążkowiowej mózgu. Komórki terapeutyczne osadzano na szkieletach z usieciowanego *in situ* lizatu płytkowego. Wielkość uszkodzenia mózgowia i komórkową reakcję zapalną szacowano po 7, 14 i 21 dniach od transplantacji. Do oceny wpływu egzogennych komórek na badane parametry reakcji poniedokrwiennej mózgu wykonano barwienia immunohistochemiczne z przeciwciałami skierowanymi przeciwko komórkom śródbłonkowym (RECA-1), glejowym (GFAP), proliferującym (Ki67), neuralnym i neuronom (nestyna, NF200) oraz makrofagom (ED1).

Transplantacja ludzkich WJ-MSC i W-EPC do uszkodzonego prążkowia mózgu szczura skutkowała istotnym zmniejszeniem wielkości uszkodzenia we wszystkich wariantach czasowych
w porównaniu do zwierząt, którym podano jedynie lizat płytkowy. W 14 dniu obserwowano maksymalną odpowiedź układu immunologicznego ze strony tkanki. Na podstawie analizy immunohistochemicznej po transplantacji WJ-MSC/EPC stwierdzono w uszkodzonej tkance wyraźne zmniejszenie poziomu markera odpowiedzi zapalnej (ED1) i glejowego (GFAP). Ponadto zaobserwowano zwiększoną liczbę naczyń krwionośnych (RECA-1) i komórek wykazujących obecność markera neuralnego (nestyna) i neuronalnego (NF200). Wykazano również zwiększony efekt naczynioprotekcyjny po transplantacji WJ-EPC w porównaniu do komórek WJ-MSC. Z drugiej strony te ostatnie wykazywały silniejsze działanie przeciwzapalne (zmniejszenie nacieku ED1), jak
i hamujące w stosunku do wytwarzania się blizny glejowej ze znamiennym spadkiem liczby komórek GFAP pozytywnych.

Wyniki moich badań wskazują na zdolność WJ-MSC do różnicowania się w kierunku śródbłonka (WJ-EPC) in vitro zarówno pod wpływem środowiska indukującego EGM-2 jak
i w warunkach obniżonego stężenia tlenu w hodowli. Oba badane typy komórek są zdolne do wydzielania czynników mogących odgrywać rolę w naczynio- i neuroprotekcji uszkodzonej tkanki nerwowej. Natomiast, w przeciwieństwie do komórek MSC pochodzących z dorosłych tkanek, dodatkowa ich stymulacja agonistami receptorów Toll-podobnych (Poly (I:C) i LPS) skutkuje jedynie nieznacznym zwiększeniem sekrecji TGF-B1, IL-6 o możliwym działaniu przeciwzapalnym. Może to być efektem odmiennej lub niepełnej dojrzałości immunologicznej komórek MSC pochodzenia płodowego wyrażonej m.in. niską ekspresją receptorów TLR¾. Transplantacja ludzkich WJ-MSC
i WJ-EPC do skrawków hipokampa lub okolicy korowo-podkorowej w modelach niedokrwienia mózgu szczura *ex vivo* (OHC) i *in vivo* (OUA), skutkuje zmniejszeniem uszkodzenia ischemicznego tkanki. Uszkodzony ischemicznie *ex vivo* region CA1 skrawków hipokampa reaguje na współhodowlę
z badanymi komórkami mezenchymalnymi znamiennym zmniejszeniem nekrozy komórek
i stabilizacją sieci naczyniowej. W badaniach in vivo (trwających do 21 dni po transplantacji komórek) obserwuje się dodatkowo zmniejszenie postischemicznej aktywacji gleju i obniżenie liczby komórek nacieku zapalnego w okolicy uszkodzenia. Zaobserwowano tam również istotne zwiększenie usieciowienia naczyń krwionośnych po podaniu WJ-EPC, wskazujące na wzmożone działanie naczynioprotekcyjne komórek mezenchymalnych indukowanych *in vitro* w kierunku śródbłonkowym. W sumie skutkuje to znamiennym statystycznie zmniejszeniem obszaru uszkodzenia mózgu ocenianego metodą morfometryczną.

**Piśmiennictwo**

[1] N. Kanyal, „The Science of Ischemic Stroke: Pathophysiology & Pharmacological Treatment”, *Int. J. Pharma Res. Rev.*, t. 4, nr 10, grudz. 2015.

[2] G. Stoll, C. Kleinschnitz, i B. Nieswandt, „Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: novel insights and targets for treatment”, *Blood*, t. 112, nr 9, ss. 3555–3562, lis. 2008.

[3] G. S. A. Sliem, „Thyroid Dysfunction in Acute Ischemic Stroke in Medical Intensive Care Unit in Zagazig University Hospitals”, *IJAR*, 2014.

[4] Y.-L. Chang, S.-H. Hung, W. Ling, H.-C. Lin, H.-C. Li, i S.-D. Chung, „Association between Ischemic Stroke and Iron-Deficiency Anemia: A Population-Based Study”, *PLOS ONE*, t. 8, nr 12, s. e82952, grudz. 2013.

[5] G. J. del del Zoppo, „Inflammation and the Neurovascular Unit in the Setting of Focal Cerebral Ischemia”, *Neuroscience*, t. 158, nr 3, ss. 972–982, luty 2009.

[6] G. J. del Zoppo, M. Moskowitz, i M. Nedergaard, „7 - The Neurovascular Unit and Responses to Ischemia A2 - Wong, James C. GrottaGregory W. AlbersJoseph P. BroderickScott E. KasnerEng H. LoA. David MendelowRalph L. SaccoLawrence K.S.”, w *Stroke (Sixth Edition)*, London: Elsevier, 2016, ss. 90–101.

[7] G. J. del Zoppo, „The neurovascular unit in the setting of stroke”, *J. Intern. Med.*, t. 267, nr 2, ss. 156–171, luty 2010.

[8] A. Tyndall, „Successes and failures of stem cell transplantation in autoimmune diseases”, *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, t. 2011, ss. 280–284, 2011.

[9] K. Prasad *i in.*, „Intravenous autologous bone marrow mononuclear stem cell therapy for ischemic stroke: a multicentric, randomized trial”, *Stroke*, t. 45, nr 12, ss. 3618–3624, grudz. 2014.

[10] V. Aguilera *i in.*, „Endothelium Trans Differentiated from Wharton’s Jelly Mesenchymal Cells Promote Tissue Regeneration: Potential Role of Soluble Pro-Angiogenic Factors”, *PLoS ONE*, t. 9, nr 11, lis. 2014.

[11] P. Obtulowicz, W. Lech, L. Strojek, A. Sarnowska, i K. Domanska-Janik, „Induction of Endothelial Phenotype From Wharton’s Jelly-Derived MSCs and Comparison of Their Vasoprotective and Neuroprotective Potential With Primary WJ-MSCs in CA1 Hippocampal Region Ex Vivo”, *Cell Transplant.*, t. 25, nr 4, ss. 715–727, 2016.

[12] K. Drela *i in.*, „Enhanced neuro-therapeutic potential of Wharton’s Jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells culture”, *Cytotherapy*, t. 18, nr 4, ss. 497–509, kwi. 2016.

[13] I. Kalaszczynska i K. Ferdyn, „Wharton’s jelly derived mesenchymal stem cells: future of regenerative medicine? Recent findings and clinical significance”, *BioMed Res. Int.*, t. 2015, s. 430847, 2015.

[14] J.-Y. Hsieh *i in.*, „Mesenchymal stem cells from human umbilical cord express preferentially secreted factors related to neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis”, *PloS One*, t. 8, nr 8, s. e72604, 2013.

[15] R. L. Clifford, K. Deacon, i A. J. Knox, „Novel Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) by Transforming Growth Factor β1 REQUIREMENT FOR Smads, β-CATENIN, AND GSK3β”, *J. Biol. Chem.*, t. 283, nr 51, ss. 35337–35353, grudz. 2008.

[16] L. Wei, J. P. Erinjeri, C. M. Rovainen, i T. A. Woolsey, „Collateral Growth and Angiogenesis Around Cortical Stroke”, *Stroke*, t. 32, nr 9, ss. 2179–2184, wrz. 2001.

[17] T. Asahara *i in.*, „Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization”, *Circ. Res.*, t. 85, nr 3, ss. 221–228, sie. 1999.

[18] V. Sharma *i in.*, „A novel population of α-smooth muscle actin-positive cells activated in a rat model of stroke: an analysis of the spatio-temporal distribution in response to ischemia”, *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.*, t. 32, nr 11, ss. 2055–2065, lis. 2012.

[19] S. Di Santo, S. Seiler, A.-L. Fuchs, J. Staudigl, i H. R. Widmer, „The secretome of endothelial progenitor cells promotes brain endothelial cell activity through PI3-kinase and MAP-kinase”, *PloS One*, t. 9, nr 4, s. e95731, 2014.

[20] D. A. Greenberg i K. Jin, „Vascular Endothelial Growth Factors (VEGFs) and Stroke”, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*, t. 70, nr 10, ss. 1753–1761, maj 2013.

[21] A. Dobolyi, C. Vincze, G. Pál, i G. Lovas, „The neuroprotective functions of transforming growth factor beta proteins”, *Int. J. Mol. Sci.*, t. 13, nr 7, ss. 8219–8258, 2012.

[22] A. Lahiani *i in.*, „Human placental eXpanded (PLX) mesenchymal-like adherent stromal cells confer neuroprotection to nerve growth factor (NGF)-differentiated PC12 cells exposed to ischemia by secretion of IL-6 and VEGF”, *Biochim. Biophys. Acta*, t. 1853, nr 2, ss. 422–430, luty 2015.

[23] R. Perígolo-Vicente, K. Ritt, C. F. Gonçalves-de-Albuquerque, H. C. Castro-Faria-Neto, R. Paes-de-Carvalho, i E. Giestal-de-Araujo, „IL-6, A1 and A2aR: A crosstalk that modulates BDNF and induces neuroprotection”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, t. 449, nr 4, ss. 477–482, lip. 2014.

[24] N. Segev-Amzaleg, D. Trudler, i D. Frenkel, „Preconditioning to mild oxidative stress mediates astroglial neuroprotection in an IL-10-dependent manner”, *Brain. Behav. Immun.*, t. 30, ss. 176–185, maj 2013.

[25] S. G. Levin i O. V. Godukhin, „Anti-inflammatory cytokines, TGF-β1 and IL-10, exert anti-hypoxic action and abolish posthypoxic hyperexcitability in hippocampal slice neurons: Comparative aspects”, *Exp. Neurol.*, t. 232, nr 2, ss. 329–332, grudz. 2011.

[26] S. Sharma, B. Yang, X. Xi, J. C. Grotta, J. Aronowski, i S. I. Savitz, „IL-10 directly protects cortical neurons by activating PI-3 kinase and STAT-3 pathways”, *Brain Res.*, t. 1373, ss. 189–194, luty 2011.

[27] Z. Yang *i in.*, „Paracrine factors secreted by endothelial progenitor cells prevent oxidative stress-induced apoptosis of mature endothelial cells”, *Atherosclerosis*, t. 211, nr 1, ss. 103–109, lip. 2010.

[28] K. J. Park, E. Park, E. Liu, i A. J. Baker, „Bone marrow-derived endothelial progenitor cells protect postischemic axons after traumatic brain injury”, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, t. 34, nr 2, ss. 357–366, luty 2014.

[29] G. Ritfeld i M. Oudega, „Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell Transplant Survival in the Injured Rodent Spinal Cord”, *J. Bone Marrow Res.*, paź. 2014.

[30] Y. Hayon, O. Dashevsky, E. Shai, D. Varon, i R. R. Leker, „Platelet lysates stimulate angiogenesis, neurogenesis and neuroprotection after stroke”, *Thromb. Haemost.*, t. 110, nr 2, ss. 323–330, sie. 2013.

[31] Y. Hayon, O. Dashevsky, E. Shai, A. Brill, D. Varon, i R. R. Leker, „Platelet microparticles induce angiogenesis and neurogenesis after cerebral ischemia”, *Curr. Neurovasc. Res.*, t. 9, nr 3, ss. 185–192, sie. 2012.

[32] Y. Hayon, O. Dashevsky, E. Shai, D. Varon, i R. R. Leker, „Platelet microparticles promote neural stem cell proliferation, survival and differentiation”, *J. Mol. Neurosci. MN*, t. 47, nr 3, ss. 659–665, lip. 2012.

[33] T. M. Fortunato, C. Beltrami, C. Emanueli, P. A. De Bank, i G. Pula, „Platelet lysate gel and endothelial progenitors stimulate microvascular network formation in vitro: tissue engineering implications”, *Sci. Rep.*, t. 6, maj 2016.

[34] M. Janowski, E. Gornicka-Pawlak, H. Kozlowska, K. Domanska-Janik, J. Gielecki, i B. Lukomska, „Structural and functional characteristic of a model for deep-seated lacunar infarct in rats”, *J. Neurol. Sci.*, t. 273, nr 1–2, ss. 40–48, paź. 2008.