KOSMOS
PROBLEMY NAUK BIOLOGICZNYCH

Tom 46, 1997
Numer 3 (236)
Strony 461–470

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

URSZULA SŁAWIŃSKA, HENRYK MAJCZYŃSKI*
Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej, Zakład Bioniki, Księcia Trojdena 4, 02-109 Warszawa.
**Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Zakład Neurofizjologii, Pasteura 3, 02-093 Warszawa.*

DORDZENIOWE TRANSPLANTY TKANKI NERWOWEJ JAKO METODA BADANIA PLASTYCZNOŚCI UKŁADU NERWOWEGO

WSTĘP

Zdolność układu nerwowego do ulegania trwałym zmianom strukturalnym i funkcjonalnym, jak również zmiany rozwojowe i zmiany kompensacyjne po uszkodzeniach ośrodkowego lub obwodowego układu nerwowego są określane ogólnym terminem plastyczności układu nerwowego. Szczególnie atrakcyjny model do badania plastyczności stanowi kompleks układu nerwowo-mięśniowego, który jest odpowiedzialny za sterowanie i wykonywanie ruchu w różnych sytuacjach behawioralnych. Procesy plastyczne, przebiegające w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) umożliwiają rozwój układu nerwowo-mięśniowego u młodych osobników, przygotowując go do pełnienia właściwych funkcji w życiu dorosłym, jak również zapewniają one przebieg procesów kompensacyjnych, których celem jest restytucja funkcji utraconych w wyniku wystąpienia uszkodzeń (mechanicznych lub chorobowych) poszczególnych elementów układu nerwowo-mięśniowego.

Procesy plastyczne w układzie nerwowo-mięśniowym mogą być wspomagane różnego rodzaju terapiami, takimi jak: ćwiczenia rehabilitacyjne, stymulacja elektryczna czy też stymulacja środkami farmakologicznymi. Inną, nową metodą, stosowaną w celu zwiększenia możliwości regeneracyjnych układu nerwowego jest zastosowanie transplantów domózgowych lub dordzeniowych różnych części płodowej tkanki nerwowej.

Choć pierwszy przeszczep do mózgu wykonano ponad sto lat temu (THOMPSON 1890), właściwie dopiero w ostatnim dwudziestoleciu przeszczepy komórek lub tkanki nerwowej do ośrodkowego układu nerwowego zostały poddane wnikliwym badaniom. Przeszczepy tkanki nerwowej, podobnie jak metody uszkodzeniowe i elektrofizjologiczne, stały się nową metodą badania zarówno funkcji fizjologicznych układu nerwowego, jak i ich odtwarzania po uszkodzeniach. Jest to również niezwykle użyteczne narzędzie do badania czynników decydujących o rozwoju i regeneracji połączeń neuronowych w OUN.

Jak wskazują negatywne wyniki doświadczeń z pierwszymi przeszczepami nadnerczy u pacjentów z chorobą Parkinsona (MADRAZO i współaut. 1987), tego typu terapia wymaga wielu badań. Dopiero kolejne próby przeszczepiania płodowych komórek istoty czarnej u pacjentów z chorobą Parkinsona okazały się bardziej obiecujące (HERMAN i ABROUS 1994). Badania takie wymagają kontynuacji, gdyż nadal nie są znane mechanizmy, dzięki którym przeszczepione płodowe komórki mają zdolność utworzenia specyficznych funkcjonalnych połączeń z komórkami układu nerwowego gospodarza. Nadal również nie wiadomo, jakie mechanizmy odpowiadają za regulację uwalniania i wychwytu neurotransmiterów w nowo powstałych połączeniach synaptycznych (HERMAN i współaut. 1985, STRECKER i współaut. 1987, STRÖMBERG i współaut. 1991).

Technika przeszczepów może być również wykorzystana w celu stworzenia „protezy" oddziaływań struktur nadrdzeniowych pnia mózgu w odizolowanym w wyniku całkowitego przecięcia odcinka rdzenia kręgowego u szczurów. Badania takie umożliwią poznanie roli plasty-

Praca finansowana przez Komitet Badań Naukowych — projekt badawczy nr 4PO5A 11512 oraz granty na działalność statutową Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej i Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie.

czności układu nerwowego w odtwarzaniu utraconych funkcji ruchowych, jak również roli oddziaływań systemów monoaminergicznych na rdzeniowe sieci neuronowe, odpowiedzialne za sterowanie ruchem.

Te i wiele innych problemów czekają na rozwiązanie. Szerokie zainteresowanie przeszczepami jest związane nie tylko z dążeniami naukowców do stworzenia możliwości naprawy uszkodzeń i restytucji utraconych funkcji w wyniku urazów lub procesów starzenia się w układzie nerwowym. Jest wielce prawdopodobne, że dalszy rozwój i udoskonalenie technik przeszczepowych pozwolą na stosowanie tych metod w terapii klinicznej, gdyż transplanty płodowej tkanki nerwowej wykazały niezwykłą zdolność do rozwoju w nowym środowisku, do tworzenia połączeń z komórkami gospodarza, do wzmacniania efektów funkcjonalnych i troficznych a także do inicjowania odtwarzania funkcji po uszkodzeniach OUN.

W niniejszym opracowaniu omówimy szerzej jedno z zastosowań techniki przeszczepów, a mianowicie przeszczepy płodowej tkanki nerwowej do odizolowanego odcinka rdzenia kręgowego, w celu wspomagania procesów kompensacyjnych układu nerwowo-mięśniowego po całkowitym przecięciu rdzenia kręgowego.

LOKOMOCJA PO CAŁKOWITYM PRZECIĘCIU RDZENIA KRĘGOWEGO

Całkowite przecięcie rdzenia kręgowego na dolnym poziomie piersiowym (Th 9-10) powoduje izolację tej części rdzenia kręgowego, która znajduje się poniżej przecięcia, od zgrubienia szyjnego w górnej części rdzenia kręgowego i struktur nadrdzeniowych, na ogół bez uszkodzenia motoneuronów, dochodzących do mięśni szkieletowych kończyn tylnych bądź przednich. U ludzi dość często dochodzi do tego typu uszkodzeń w wyniku niefortunnego skoku do wody lub w wyniku wypadków samochodowych. W zależności od poziomu i wielkości uszkodzenia rdzenia kręgowego wypadki te są często przyczyną paraliżu kończyn. U zwierząt po uszkodzeniu rdzenia kręgowego na poziomie piersiowym następuje zanik funkcji podporowych w tylnych kończynach. Zwierzęta przemieszczają się na przednich kończynach ciągnąc za sobą tylną część tułowia, przy czym tylne kończyny tylko sporadycznie wykonują naprzemienne ruchy podciągania, a stopy opierają się stroną grzbietową na podłożu. Zaburzenia te są wynikiem odcięcia dolnej części rdzenia od wpływów nadrdzeniowych, spośród których szczególną rolę odgrywają oddziaływania monoaminergiczne, a przede wszystkim oddziaływania serotoninergiczne z jądra szwu tworu siatkowatego pnia mózgu (STEINBUSCH 1984), oraz noradrenergiczne z miejsca sinawego (FUNG i BARNES 1981, COMMISSIONG i TOFFANO 1989). Znaczącą rolę monoamin w regulacji funkcji motorycznych potwierdziły badania, w których zwierzęta z całkowicie przeciętym rdzeniem kręgowym, po terapii polegającej na podawaniu serotoniny lub noradrenaliny albo ich agonistów, odzyskiwały przejściowo zdolność poruszania tylnymi kończynami i ruchy tych kończyn były podobne do ruchów lokomocyjnych zwierząt normalnych (BARBEAU i współaut. 1981, BARBEAU i ROSSIGNOL 1990, ROSSIGNOL 1996). Dostarczenie neurotransmiterów monoaminergicznych do odizolowanego rdzenia kręgowego spowodowało więc przywrócenie funkcji lokomocyjnych tylnych kończyn, choć był to efekt krótkotrwały i zanikał wraz ze zmniejszaniem się poziomu neurotransmiterów w organizmie zwierzęcia.

Podwyższenie poziomu neurotransmiterów monoaminergicznych można również uzyskać wszczepiając do odizolowanego odcinka rdzenia kręgowego wycinek z płodowego pnia mózgu, zawierający serotoninergiczne i noradrenergiczne komórki nerwowe (FOSTER i współaut. 1989, BJÖRKLUND i współaut. 1986). Przeszczepione komórki przyjmują się w organizmie gospodarza i są następnie stałym źródłem tych neuroprzekaźników. Przeszczep taki nie pełni jedynie funkcji „pompy biologicznej". Wszczepione komórki migrują na znacznym obszarze rdzenia kręgowego gospodarza, tworząc połączenia synaptyczne z jego neuronami, i to w miejscach, do których dochodziły naturalne zakończenia nerwowe zstępujacych dróg monoaminergicznych (RAJAOFETRA i współaut. 1992). Przeszczepione komórki zostają również unerwione przez aksony neuronów rdzenia kręgowego gospodarza (MAXWELL i FOSTER 1991). Może to oznaczać, że oddziaływania przeszczepionej tkanki nerwowej mogą w pewnym stopniu zastępować, uszkodzone w wyniku przecięcia, wpływy zstępujących dróg monoaminergicznych a także, że wydzielanie neurotransmiterów z tych neuronów może być modyfikowane przez układ nerwowy gospodarza.

Od poziomu neurotransmiterów monoaminergicznych w odizolowanym odcinku rdzenia zależą możliwości kompensacyjne uszkodzonego lub odizolowanego rdzenia kręgowego (COMMISSIONG i TOFFANO 1989, BARBEAU i współaut. 1981, BARBEAU i ROSSIGNOL 1990, ROSSIGNOL

1996). Można więc sądzić, że transplantacja tkanki płodowej, zawierającej komórki monoaminergiczne (serotoninergiczne lub noradrenergiczne), doprowadzi do zwiększenia poziomu tych neurotransmiterów w odizolowanej części rdzenia kręgowego i pozwoli uzyskać znaczącą kompensację utraconych funkcji ruchowych. Wiadomo bowiem, że komórki transplantu, tworząc sieć połączeń z układem nerwowym transplantobiorcy, nie tylko wyprodukują neurotransmitery, ale również skierują je w odpowiednie miejsce w rdzeniu kręgowym (RAJAOFETRA i współaut. 1992). Należy się więc spodziewać, że w ten sposób stworzone zostaną warunki do uzyskania większej kompensacji utraconych funkcji ruchowych.

MODEL DOŚWIADCZALNY — SZCZUR Z USZKODZONYM RDZENIEM KRĘGOWYM

Zwierzęta z całkowicie przeciętym rdzeniem (tzw. zwierzęta rdzeniowe) są używane jako model w doświadczeniach, które odwzorowują sytuacje mechanicznych pourazowych lub pooperacyjnych uszkodzeń rdzenia kręgowego, spotykane u ludzi. Badania zwierząt rdzeniowych są prowadzone już od początku naszego stulecia, kiedy to zademonstrowano, że po uszkodzeniu rdzenia kręgowego zarówno u zwierząt, jak i u ludzi, automatyczne ruchy kończyn mogą być generowane przez odizolowaną część rdzenia kręgowego (SHERRINGTON 1910, BROWN 1911, RIDDOCH 1917). Dalsze badania prowadzone na zwierzętach przyczyniły się do lepszego poznania mechanizmów kontrolujących ruch i dostarczyły podstawowej wiedzy o działaniu układu nerwowo-mięśniowego i podstawowych procesach sterowania ruchem.

W prezentowanej pracy są przedstawione wyniki badań prowadzonych na dorosłych szczurach, którym w trzecim miesiącu życia całkowicie przecinano rdzeń kręgowy na poziomie piersiowym Th 9-10. Procedura uszkadzania rdzenia kręgowego jest prowadzona w aseptycznych warunkach i polega na całkowitym usunięciu 3 mm tkanki rdzenia u zwierząt pozostających w narkozie. Przez okres 10–14 dni od uszkodzenia rdzenia kręgowego zwierzęta wymagają specjalnej opieki, polegającej na wyciskaniu moczu i codziennym podawaniu antybiotyków. Miesiąc po całkowitym przecięciu rdzenia kręgowego u wybranej losowo części zwierząt przeprowadza się następną operację, której celem jest dostarczenie tkanki płodowej do odizolowango odcinka rdzenia kręgowego (SŁAWIŃSKA i MAJCZYŃSKI 1997a, b).

TECHNIKA WYKONYWANIA PRZESZCZEPÓW DORDZENIOWYCH

Szereg doświadczeń przeprowadzonych w ostatnim dwudziestoleciu pozwoliło na opracowanie warunków gwarantujących przyjęcie transplantu przez układ nerwowy gospodarza. Wykazano, że największe szanse przeżycia ma tkanka nerwowa pobrana z płodu, przy czym optymalny wiek płodu jest zróżnicowany ze względu na rodzaj pobieranej tkanki (BJÖRKLUND i współaut. 1983). Wprawdzie przeszczepy wycinków dorosłej tkanki nerwowej również mają szansę na częściowe przeżycie, jednakże komórki tkanki nerwowej pobranej z płodu w momencie wczesnej fazy ich różnicowania się, gdy wypustki aksonalne dopiero zaczynają się kształtować, są mniej narażone na zniszczenie i ponadto zachowują możliwości dalszego rozwoju i różnicowania już po przyjęciu się w środowisku gospodarza.

Wybór tkanki nerwowej przeznaczonej do transplantacji zależy od rodzaju i miejsca uszkodzenia OUN gospodarza. Odpowiednio wypreparowany wycinek tkanki nerwowej należy następnie umieścić w optymalnej lokalizacji tak, by aksony transplantowanych komórek nerwowych miały potencjalne możliwości migracji i nawiązania kontaktu synaptycznego z naturalnym miejscem ich rzutowania w układzie nerwowym gospodarza.

Na podstawie dotychczas prowadzonych badań wydaje się, że układ nerwowy jest „immunologicznie uprzywilejowany" i ewentualne odrzuty transplantów są najczęściej spowodowane błędami (infekcją lub dużym krwawieniem) w trakcie operacji. Obserwowane sporadycznie odrzuty przeszczepionej tkanki stanowią jednak problem, którego rozwiązanie wymaga dalszych badań, nie tylko z myślą o stosowaniu transplantów w pracach badawczych, ale również w terapii klinicznej. Jednym z rozwiązań, stosowanym w pracach eksperymentalnych, jest wykorzystywanie wsobnych szczepów zwierząt i zapewnienie w ten sposób zgodności tkanki transplantowanej z tkanką transplantobiorcy (np.: szczep szczurów Sprague Dowley lub Wistar).

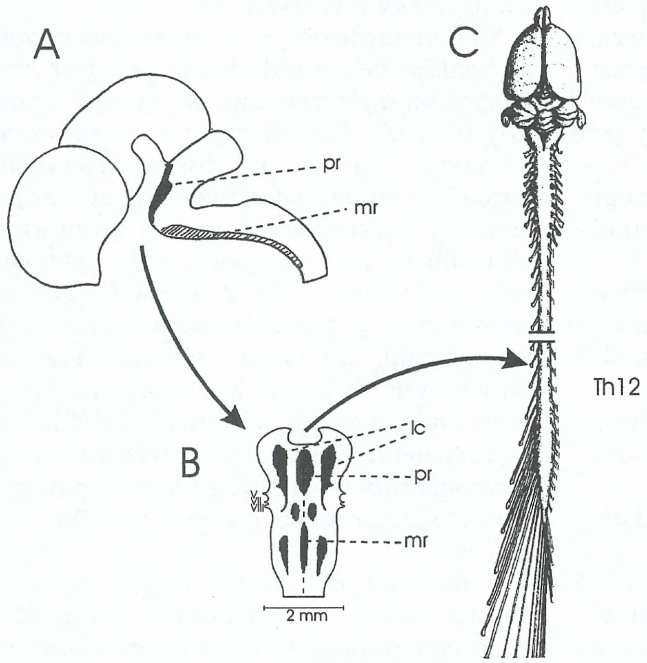
W naszych badaniach, miesiąc po całkowitym przecięciu, do części odizolowanej rdzenia kręgowego dorosłego szczura przeszczepiamy wycinek płodowej tkanki nerwowej odpowiadający obszarowi pnia mózgu, który obejmuje ją-

dra szwu i okolice miejsca sinawego. Płody pobierane są u głęboko uśpionych ciężarnych samic szczurzych w 14 dniu ciąży (dzień zapłodnienia jest liczony jako dzień 0) po zastosowaniu cięcia cesarskiego. W tym okresie ciąży (E14-E15; E ang. embryonic) płody osiągają długość CRL (CRL ang. crown-rump length, tzn. długość płodu od głowy do pośladków) około 10–14 mm. Pobrane w tym okresie komórki serotoninergiczne jądra szwu, jak również komórki noradrenergiczne okolic miejsca sinawego są już zróżnicowane i występują w typowych dla siebie obszarach pnia mózgu (DUNNET i BJÖRKLUND 1992). Natychmiast po pobraniu płodów samica zostaje uśpiona letalną dawką narkozy.

Na rycinie 1 przedstawiono schematycznie główne etapy pozyskania wycinka płodowej tkanki nerwowej i jego trasnplantacji do rdzenia kręgowego biorcy poniżej przecięcia. Do dalszych etapów preparowania z użyciem mikroskopu sekcyjnego pozostawia się tylko części płodu zawierające górne części rdzenia kręgowego, pnia mózgu i śródmózgowia. Następnie z pnia mózgu preparuje się wycinek tkanki nerwowej, obejmujący jądra szwu (zawierające komórki serotoninergiczne) i okolice miejsca sinawego (zawierające komórki noradrenergiczne). Wypreparowane wycinki tkanki płodowej są przeszczepiane w tym samym dniu do odizolowanego odcinka rdzenia kręgowego szczurów, u których przecięcie rdzenia przeprowadzono miesiąc wcześniej.

Wypreparowanie tkanki płodowej, przeznaczonej do transplantacji, wymaga dokładności i w czasie tej czynności należy przestrzegać odpowiedniej procedury. Na przykład, tkanka płodowa powinna być zawsze całkowicie zanurzona w sterylnym płynie Hanksa z dodatkiem glukozy (6 g/l). Należy unikać nakłuwania, ściskania czy też naciągania preparowanej tkanki płodowej, gdyż może to prowadzić do obumierania preparowanych wycinków. Należy również zwrócić szczególną uwagę, by wypreparować układ nerwowy z otaczających go opon i wyściółek, które po dostaniu się do układu nerwowego gospodarza rozwijają się bardzo szybko. U płodów powyżej E12 (CRL: 8–9 mm) tkanka ta różni się wyraźnie od tkanki nerwowej, gdyż jest całkowicie przezroczysta i dość łatwo daje się ściągnąć.

Procedura transplantacji płodowej tkanki nerwowej jest prowadzona w szczególnie aseptycznych warunkach. Pojedynczy wycinek tkanki nerwowej jest transplantowany do rdzenia kręgowego na poziomie jednego segmentu poniżej miejsca całkowitego przecięcia, przyśrodkowo 1 mm poniżej powierzchni rdzenia. Transplant wprowadza się do rdzenia kręgowego biorcy dokładną strzykawką typu Hamiltonówki etapami, w czasie około 3 minut, by minimalizować uszkodzenie tkanki gospodarza. Igła jest wprowadzana do rdzenia kręgowego za pomocą mikromanipulatora. Po podaniu transplantu igłę pozostawia się nieruchomo w rdzeniu przez około 10 minut, po czym wysuwa się ją stopniowo. Przez okres 1 tygodnia szczurom podaje się codziennie antybiotyki. Przez okres 3–4 miesięcy po operacji szczury są starannie pielęgnowane i badane w trakcie cotygo-



Ryc. 1. Schemat podstawowych etapów procesu wypreparowania tkanki nerwowej płodu, przeznaczonej do przeszczepu, i samej transplantacji dordzeniowej.

A, B — lokalizacja miejsc, w których znajdują się rozwijające się komórki serotoninergiczne w obszarze jąder szwu: pr — część mostowa (ang. pontine raphe nucleus), mr — część opuszkowa (ang. medullary raphe nucleus) oraz komórki noradrenergiczne w obszarze miejsca sinawego: (lc — ang. locus coeruleus). V, VII, VIII — kolejne nerwy czaszkowe. C — miejsce podania transplantu wycinka tkanki nerwowej w rdzeniu kręgowym: Th12 — dwunasty segment piersiowego odcinka rdzenia kręgowego, znajdujący się poniżej miejsca całkowitego przecięcia.

dniowych sesji doświadczalnych, polegających na prowadzeniu wielu różnych testów behawioralnych w celu określenia stopnia poprawy funkcji ruchowych po zastosowaniu terapii transplantów dordzeniowych.

METODY OCENY FUNKCJONALNEJ SKUTECZNOŚCI PROCESÓW PLASTCZNOŚCI

Metody oceny poziomu restytucji funkcji utraconych w wyniku uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego obejmują rozmaite testy behawioralne, dzięki którym możliwe jest określenie stopnia poprawy uzyskanej w wyniku stosowania różnego rodzaju terapii (GOLDBERGER i współaut. 1990). Metody te obejmują badania dotyczące restytucji funkcji lokomocyjnych i odtworzenia (lub zachowania) podstawowych funkcji odruchowych i czuciowych. Dzięki prowadzonym testom istnieją więc możliwości analizy charakteru deficytów ruchowych i określenie, jakie umiejętności ruchowe zostały przywrócone, a których jest ciągle brak.

W szczególności stosuje się takie testy, które umożliwią odróżnienie restytucji funkcji sterowanych na poziomie rdzenia kręgowego — na przykład (1) placing proprioceptywny (postawienie kończyny na przeszkodzie w wyniku pobudzenia receptorów czucia głębokiego, to znaczy receptorów umożliwiających odczuwanie ułożenia części ciała oraz ich ruchu biernego lub czynnego) lub (2) lokomocja automatyczna na ruchomym bieżniku, od restytucji funkcji sterowanych poprzez struktury nadrdzeniowe — na przykład (1) placing dotykowy (postawienie kończyny na przeszkodzie w wyniku pobudzenia receptorów skórnych) lub (2) lokomocja swobodna. Jak widać, reakcja polegająca na postawieniu kończyny na przeszkodzie, jak również lokomocja mogą być kontrolowane przez OUN na różnych poziomach. I tak, placing dotykowy, który jest wywoływany poprzez lekki dotyk skóry stopy (ugięcie sierści na różnych powierzchniach stopy) jest testem sprawdzającym działanie systemu oddziaływań struktur nadrdzeniowych (m.in. układu piramidowego; AMASSIAN 1979, BREGMAN i GOLDBERGER 1983a, b, CZARKOWSKA-BAUCH 1990), gdy natomiast placing prorioceptywny (wyprost stawu) jest odruchem kontrolowanym na poziomie rdzeniowym (AMASSIAN 1979, GOLDBERGER 1988a, b). Prawidłowość wykonywania reakcji odruchowej analizuje się badając występowanie poszczególnych faz tej reakcji. W tabeli 1 podano skalę służącą ocenie prawidłowości wykonywanej reakcji placingu.

Tabela 1. Skala oceny odruchowej reakcji placingu (ROBINSON i GOLDBEREGER 1986)

Ocena	Opis reakcji
0	brak reakcji
1	krótkotrwałe zgięcie kończyny w stawie skokowym
2	zgięcie w stawie skokowym z następującym wyprostem kończyny w kierunku bodźca bez postawienia kończyny
3	zgięcie w stawie skokowym z następującym wyprostem kończyny w kierunku bodźca, postawieniem kończyny i częściowym podporem ciała
4	pełne przestawienie kończyny z wcześniejszym wycofaniem i utrzymaniem ciężaru ciała po postawieniu kończyny na podłożu

Skoordynowany ruch kończyn w trakcie lokomocji również jest kontrolowany na różnych poziomach ośrodkowego układu nerwowego. W związku z tym badanie lokomocji zwierząt swobodnie poruszających się po bieżni (GOLDBERGER 1977, 1988a, b, GOLDBERGER i współaut. 1990) i u zwierząt na ruchomym bieżniku (np. ruchy lokomocyjne tylnych kończyn u zwierząt rdzeniowych, gdy przednie kończyny są podparte nieruchomo nad bieżnikiem) (GOLDBERGER 1977, BARBEAU i ROSSIGNOL 1987) daje możliwość badania restytucji funkcji ruchowych na różnych poziomach sterowania ośrodkowego układu nerwowego. Do oceny prawidłowości wykonywanych ruchów lokomocyjnych wprowadzono również wielostopniową skalę, której stosowanie umożliwia porównywanie stopnia restytucji funkcji u różnych osobników (tab. 2).

OCENA SKUTECZNOŚCI TRANSPLANTU U SZCZURÓW RDZENIOWYCH

Skuteczność transplantu w procesach kompensacyjnych układu nerwowego, uruchamianych po całkowitym przecięciu rdzenia kręgowego, może być oceniona na podstawie zmian w efektywności działania układu nerwowo-mięśniowego w trakcie wykonywania ruchów lokomocyjnych tylnych kończyn. Wiadomo, że u ssaków w czasie lokomocji aktywnością poszczególnych mięśni sterują rozdzielne lecz wzajemnie sprzężone generatory rdzeniowe pojedynczych kończyn (GRILLNER 1975, DELIAGINA i współaut. 1983). Generatory ruchów lokomo-

Tabela 2. Skala oceny lokomocji (HASHIMOTO i FUKUDA 1991 — dane zmodyfikowane)

Ocena	Opis reakcji
0	brak spontanicznych ruchów lokomocyjnych, brak reakcji na uciskanie ogona, brak funkcji podporowych
1	brak funkcji podporowych, śladowe reakcje na uciskanie ogona — nieskoordynowane podciąganie kończyn tylnych w powietrzu bez kontaktu podeszwy z podłożem
2	brak funkcji podporowych, ucisk ogona wywołuje skoordynowane naprzemienne ruchy kończyn tylnych bez kontaktu podeszwy z podłożem, stopy ocierają o podłoże grzbietową stroną palców
3	brak funkcji podporowych, ucisk ogona wywołuje skoordynowane naprzemienne ruchy kończyn tylnych połączone czasami z wyprostem palców tuż przed postawieniem stopy stroną podeszwową na podłożu
4	ucisk ogona wywołuje wyprost tylnych kończyn z postawieniem stóp na palcach i uniesieniem wysoko ciała, a następnie skoordynowane naprzemienne ruchy kończyn tylnych połączone czasami z wyprostem palców tuż przed postawieniem stopy stroną podeszwową na podłożu
5	ucisk ogona wywołuje wyprost tylnych kończyn z postawieniem stóp na palcach i uniesieniem wysoko ciała, a następnie skoordynowane naprzemienne ruchy kończyn tylnych połączone z wyprostem palców tuż przed postawieniem stopy stroną podeszwową na podłożu
6	normalna lokomocja

cyjnych wszystkich kończyn są sterowane przez zstępujące wpływy ze struktur nadrdzeniowych, w przewodzeniu których uczestniczą między innymi, neurotransmitery monoaminergiczne (COMMISSIONG 1981, GRILLNER 1975, GRILLNER i SHIK 1973, SAKAI i współaut. 1973). W naszych badaniach zanik tych wpływów, spowodowany całkowitym przecięciem rdzenia kręgowego ma być kompensowany nowo powstałymi połączeniami z komórek transplantu (SŁAWIŃSKA i MAJCZYŃSKI 1997a, b).

Możliwość wywołania ruchów lokomocyjnych tylnych kończyn u szczurów rdzeniowych badano dwa miesiące po transplantacji tkanki płodowej. W tym celu tułów szczura wraz z przednimi kończynami był podtrzymywany na ruchomym wózku (substytut ruchomego bieżnika) tak, by tylne kończyny miały możliwość poruszania się po bieżni. Przesuwanie wózka wraz ze stymulacją dotykową ogona wywoływało ruchy lokomocyjne tylnych kończyn. U szczurów rdzeniowych-kontrolnych nastąpił całkowity zanik funkcji posturalnych tylnych kończyn. Przytrzymywanie ogona i jego uciskanie wywoływało w małym stopniu skoordynowane, naprzemienne ruchy tylnych kończyn za poruszającym się wózkiem. Ponadto szczury te nie potrafiły postawić stóp stroną podeszwową na palcach. Natomiast naprzemienne i skoordynowane ruchy kończyn u szczurów rdzeniowych po transplantacji były połączone ze stawianiem stóp na palcach, a w cyklu poszczególnych kroków można było wyróżnić pełne fazy przeniesienia i podporu, jak w trakcie normalnej lokomocji (ryc. 2). Prawidłowość ruchów lokomocyjnych, wykonywanych przez szczury po przeszczepie, może być oceniona (przy użyciu skali zawartej w tabeli 2) na poziomie 5, gdy u kontrolnych szczurów rdzeniowych ocena możliwości lokomotorycznych nie przekraczała wartości trzech.

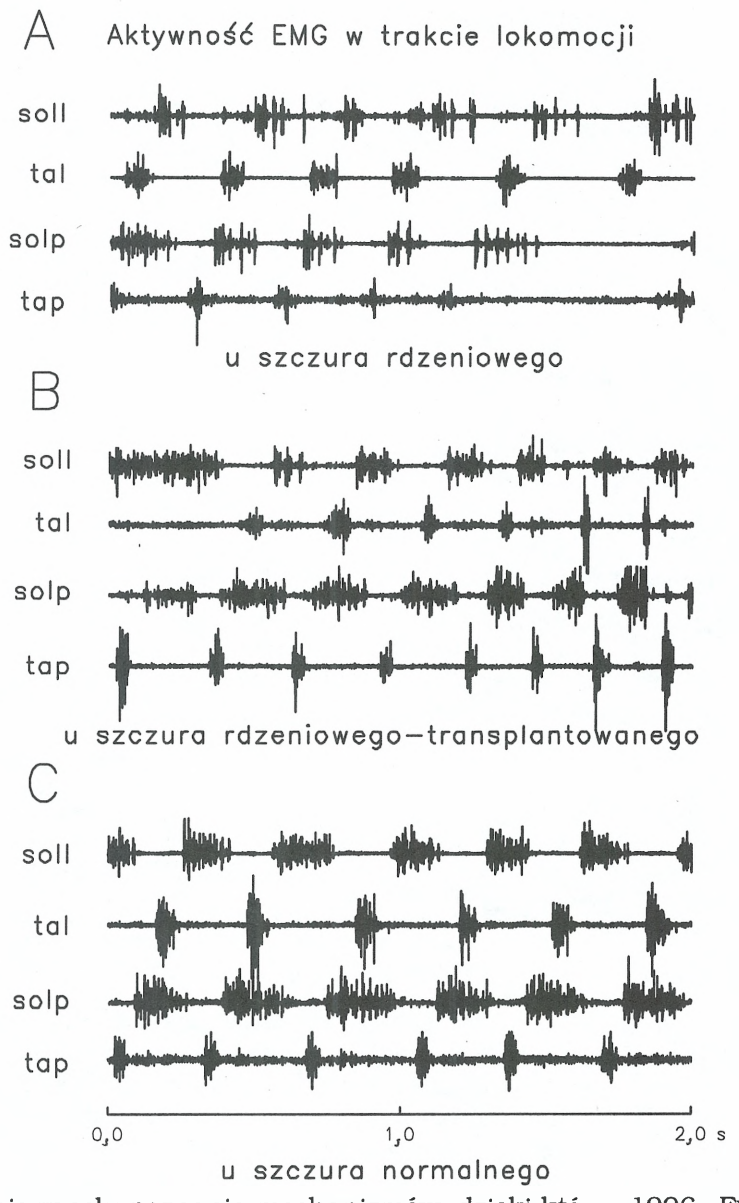
W czasie lokomocji rejestrowano czynność elektryczną (EMG skrót od elektromiografia) wybranych mięśni prostowników i zginaczy aktywnych odpowiednio w fazach podporu i przeniesienia kończyny. Przykład zarejestrowanych sygnałów EMG u różnych szczurów: normalnego, rdzeniowego-kontrolnego (3 miesiące po uszkodzeniu rdzenia kręgowego) i rdzeniowego po transplantacji (3 miesiące po uszkodzeniu rdzenia kręgowego, 2 miesiące po transplantacji tkanki płodowej) przedstawia rycina 3. U szczura rdzeniowego widać wyraźnie, że skurczom poszczególnych mięśni odpowiadają nierównomiernie zagęszczone sygnały EMG, które charakteryzują się zgrupowanymi potencjałami w postaci krótkotrwałych paczek (kloniczna aktywność). Taka aktywność EMG nie występuje w trakcie skurczu mięśni u zwierząt normalnych i świadczy o uszkodzeniu wpływów struktur nadrdzeniowych. Natomiast u szczura rdzeniowego po transplantacji już na podstawie zwykłego porównania widać, że aktywność EMG jest bardzo podobna do aktywności rejestrowanej u szczura normalnego. Badania elektromiograficzne są najbardziej czułą metodą umożliwiającą analizę aktywności ruchowej u swobodnie poruszających się zwierząt. Zarejestrowane sygnały EMG wymagają oczywiście przeprowadzenia dalszej szczegółowej analizy komputerowej, której w niniejszym krótkim opracowaniu nie omawiamy. Nie mniej dowodzi ona, że nowo utworzona sieć oddziaływań komórek transplantu wspiera działanie sieci neuronowej odizolowanego odcinka rdzenia kręgowego, zapewniając skoordynowane, naprzemienne ruchy tylnych kończyn (SŁAWIŃSKA i MAJCZYŃSKI 1997a, b).

Ryc. 2. Szczur rdzeniowy z tułowiem umieszczonym na wózku tak, by tylne kończyny miały możliwość kroczenia po bieżni:

A — szczur rdzeniowy kontrolny; B — szczur rdzeniowy z transplantem. Należy zwrócić uwagę na sposób stawiania tylnych kończyn: u szczura rdzeniowego — kończyny stawiane są nieprawidłowo stroną grzbietową palców; u szczura rdzeniowego z transplantem poszczególne kroki charakteryzują się pełną fazą przeniesienia i podporu ze stawianiem stóp stroną podeszwową na palcach.

Znacząca poprawa w jakości wykonywanych naprzemiennych ruchów kroczących tylnych kończyn u szczurów rdzeniowych po transplantacji tkanki płodowej, zawierającej komórki serotoninergiczne i/lub noradrenergiczne, jest związana prawdopodobnie ze zwiększonym pobudzeniem sieci interneuronów i motoneuronów ośrodkowego układu nerwowego gospodarza. U szczurów rdzeniowych zaopatrzonych w transplantowane komórki serotoninergiczne i noradrenergiczne obserwuje się niskoprogowe i krótkolatencyjne odruchy rdzeniowe, które sporadycznie są obserwowane u szczurów kontrolnych. I tak, u szczura rdzeniowego z transplantem dotykając częścią proksymalną tylnych kończyn bądź pośladkami do krawędzi stopnia wysokości około 3 cm wywołuje się szybką reakcję przestawienia tylnych kończyn na stopień do tyłu. U szczurów rdzeniowych reakcja ta występuje dopiero na dotknięcie kończyny na poziomie pięty. Również w przypadku dotknięcia strony grzbietowej stopy powodującego jedynie nieznaczny wyprost w stawie skokowym, u szczurów z transplantem obserwuje się reakcję składającą się z pełnej fazy wycofania i postawienia stopy na przeszkodzie (placing proprioceptywny) (w tab. 1 poziom 2–3). Taka reakcja nie występuje u szczurów rdzeniowych-kontrolnych. Ponadto wyprostowanie kończyny w stawie biodrowym powoduje wyprost kończyny tej samej obręczy po przeciwległej stronie ciała. Wywołanie tego typu odruchów u zwierząt rdzeniowych z transplantem wskazuje na istnienie funkcjonalnych oddziaływań komórek transplantu na interneurony i motoneurony w rdzeniu kręgowym transplantobiorcy. Działanie wyżej opisanych łuków odruchowych może również wspomagać wykonywanie naprzemiennych ruchów tylnych kończyn w trakcie lokomocji takich szczurów, zapewniając poprawę ruchów lokomocyjnych kończyn obserwowaną w naszych badaniach.

Znacząca poprawa jakości ruchów lokomocyjnych tylnych kończyn, jak i nasilenie opisanych wyżej reakcji są związane, jak się przypuszcza, z obecnością komórek transplantu. W naszych badaniach obecność komórek i włókien zawierających serotoninę została potwierdzona metodami immunohistochemicznymi. W najbliższej przyszłości użycie mikroskopu elektronowego umożliwi określenie dokładnych miejsc projekcji transplantowanych komórek i zbadanie poprawności utworzonych połączeń synaptycznych. Projektowane są również bada-



Ryc. 3. Przykładowe zapisy sygnałów EMG rejestrowanych u różnych szczurów z mięśni kończyn tylnych:

sol — mięsień płaszczkowaty, prostownik stawu skokowego (ang. soleus), ta — mięsień piszczelowy przedni, zginacz stawu skokowego (ang. tibialis anterior) (l/p — lewej/prawej kończyny) w trakcie regularnej lokomocji. A — szczur rdzeniowy-kontrolny, B — szczur rdzeniowy z transplantem, C — szczur nie operowany.

nia w celu poznania mechanizmów, dzięki którym transplantowane komórki nawiązują kontakt funkcjonalny z układem nerwowym transplantobiorcy.

Przedstawiony w niniejszej pracy model doświadczalny stwarza potencjalne możliwości wieloaspektowych badań procesów plastyczności układu nerwowo-mięśniowego, stymulowanych dordzeniowym podaniem tkanki płodowej. Na rozwiązanie czeka wiele problemów dotyczących mechanizmów odpowiedzialnych za tak znaczącą poprawę w zachowaniu ruchowym szczurów z całkowicie przeciętym rdzeniem kręgowym po transplantacji tkanki płodowej. Nadal pozostaje nie wiadomym, w jaki sposób OUN transplantobiorcy steruje uwalnianiem i wychwytem neurotransmiterów produkowanych przez komórki transplantu. Badania na podobnym modelu doświadczalnym prowadzi się w wielu ośrodkach (RAJAOFETRA i współaut. 1992, YAKOVLEFF i współaut. 1994, COOPER i współaut. 1996, FERABOLI-LOHNHERR i współaut. 1997). Większość do tej pory prowadzonych badań skupiło swoją uwagę na potwierdzeniu przeżywalności komórek transplantu (FOSTER i współaut. 1989, MAXWEL i FOSTER 1991, RAJAOFETRA i współaut. 1992). Obecnie najważniejszym problemem badanym przez nas, jak i w pracowni Profesora ORSALA w Paryżu (COOPER i współaut. 1996, FERRABOLI i współaut. 1997a, b) jest potwierdzenie funkcjonalnej poprawy związanej z zastosowaną terapią transplantów dordzeniowych. W związku z tym są rozwijane również inne metody badania mechanizmów plastyczności, na przykład na poziomie komórkowym technikami mikroelektrofizjologii wewnątrzkomórkowej.

Przeprowadzone przez nas badania, w których do rdzenia kręgowego poniżej miejsca całkowitego przecięcia transplantowano wycinek tkanki płodowej, jak i wyniki doświadczeń, w których transplantowano zawiesinę komórek

serotoninergicznych (COOPER i współaut. 1996, FERABOLI-LOHNHERR i współaut. 1997a,b), wydają się potwierdzać, że możliwe jest odtwarzanie wpływów ze struktur nadrdzeniowych poprzez dostarczenie do odizolowanego odcinka rdzenia kręgowego swoistej „protezy" w postaci odpowiednich komórek tkanki nerwowej oddziałujących na sieci neuronalne rdzenia porzez wydzielanie neurotransmiterów monoaminergicznych, dzięki którym zostały stworzone warunki do uzyskania większej kompensacji utraconych funkcji ruchowych.

ETYCZNE PROBLEMY TRANSPLANTACJI TKANKI PŁODOWEJ

W transplantologii stykamy się bezpośrednio z problemami etycznymi, związanymi głównie ze stosowaną w tej terapii tkanką płodową. Już w 1987 roku w związku z zastosowaniem transplantów z tkanki płodowej u pacjentów z chorobą Parkinsona powstała idea opracowania reguł, których spełnienie dopuszczałoby badanie i stosowanie takich metod w leczeniu ludzi. Zestaw takich reguł został opracowany przez amerykańską agendę rządową — The Human Fetal Tissue Transplantation Research Panel i opublikowany 1988 roku (US Department of Health and Human Services, Public Health Services, National Institutes of Health, Report of the Human Fetal Tissue Transplantation Research Panel, US Government Printing Office).

Jest oczywiste, że niezależnie od badań prowadzonych z wykorzystaniem tkanki płodowej do przeszczepów należy szukać alternatywnych źródeł tkanki przeznaczonej do transplantacji. Temu celowi służą szerokie badania w dziedzinie hodowli komórkowych z zastosowaniem technik inżynierii genetycznej (por. GAGE i współaut. 1991). Badania prowadzone na zwierzętach z zastosowaniem metod transplantcji tkanki płodowej są jednak niezbędne dla zebrania podstawowych informacji o przeżywalności takiej tkanki i wpływie, jaki może ona wywrzeć na uszkodzone struktury układu nerwowego.

NEURAL TRANSPLANTATION — AN INVESTIGATION TOOL OF THE NERVOUS SYSTEM PLASTICITY

Summary

Although the first article on successful intracerebral transplantation was published about 100 years ego, it is only during the last two decades that transplantation of cells or neural tissue into the developing or adult central nervous system has become widely used as an experimental tool. Like brain lesion and electrophysiological techniques, neural grafting has come to provide a new way of analyzing function and functional recovery in the central nervous system.

We describe the method of neural tissue transplantation as a therapy aiming at stimulation processes of nervous system plasticity. It is known that serotoninergic and /or noradrenergic drugs can induce locomotion in spinal animals. Adult spinal rats which had received a transplant of embryonic tissue showed a greater recovery of motor function as compared to control spinal animals. The behavioral experiments showed an improvement of spinal reflexes and locomotor activity which confirm that the grafted cells of embryonic raphe nucleus, after integration with the host neuropil, are able to encourage recovery of the hindlimb locomotor function. These results suggest that the spinal transplants might develop into a suitable technique for restoration of motor function after a traumatic injury of the spinal cord. However, with respect to the clinical perspective, there is still a long way to go.

LITERATURA

AMASSIAN V. E. 1979. *The use of contact placing in analytical and synthetic studies of the higher sensorimotor control system.* [W:] H. ASANUMA i V.J. WILSON (red.) *Integration in the nervous system.* Igakv-shoin, Tokyo. 279–304.

BARBEAU H., FILION M., BÉDARD P. J. 1981. *Effects of agonists and antagonists of serotonin on spontaneous hindlimb EMG activity in chronic spinal rats.* Neuropharmacology 20, 99–107.

BARBEAU H., ROSSIGNOL S. 1987. *Recovery of locomotion after chronic spinalization in adult chronic spinal cat.* Brain Res. 412, 84–95.

BARBEAU H., ROSSIGNOL S. 1990. *The effects of serotonergic drugs on the locomotor pattern and on cutaneous reflexes of the adult chronic spinal cat.* Brain Res. 514, 55–67.

BJÖRKLUND A., STENEVI U., SCHMIDT R. H., DUNNETT S. B., GAGE F.H. 1983. *Introduction and general methods of preparation.* Acta Physiol. Scand. Suppl. 522, 1–9.

BJÖRKLUND A., NORNES H., GAGE F. H., FOSTER G., SCHULTZBERG M., STENEVI U. 1986. *Reinnervation of the denervated spinal cord by grafted noradrenetgic and serotonergic brainstem neurons.* [W:] M.E. GOLDBERGER, A. GORION i M. MURRAY (red.) *Development and Plasticity of the mammalian Spinal Cord. Section V. Regenerative Capacity of the Spinal Cord.* Fidia Research Serias, t. III, Liviana Press, Padova.

BREGMAN B. S., GOLDBERG M. E. 1983a. *Infant lesion effect. I. Development of motor behavior following neonatal spinal cord damage in cats.* Dev. Brain Res. 9, 103–118.

BREGMAN B. S., GOLDBERG M. E. 1983b. *Infant lesion effect. II. Sparing and recovery of function after spinal cord damage in newborn and adult cats.* Dev. Brain Res. 9, 119–135.

BROWN T. G. 1911. *The intrinsic factor in the act of progression in the mammal.* Proc. R. Soc. Lond. (Biol.) 84, 308–319.

COMMISSIONG J. W. 1981. *Spinal monoaminergic system: An aspect of somatic motor function.* Fed. Proc. 40, 2771–2777.

COMMISSIONG J. W., TOFFANO G. 1989. *Complete spinal cord transection at different postnatal ages: recovery of motor coordination correlated with spinal cord catecholamines.* Exp. Brain Res. 78, 597–603.

COOPER R. N., FERABOLI-LOHNHERR G., BUTLER-BROWNE G., ORSAL D., GIMENEZ Y RIBOTTA M., PRIVAT A. 1996. *Intraspinal injection of embryonic neurons maitains muscle phenotype in adult chronic spinal rats.* J. Neurosci. Res. 46, 324–329.

CZARKOWSKA-BAUCH J. 1990. *Movement and muscle activity during contact palcing of the forelimb and their relations to other postural reactions in the cat.* Exp. Brain Res. 79, 373–382.

DUNNETT S. B., BJÖRKLUND A. 1992. *Neural Transplantation. A Practical Approach.* S. B. DUNNETT, A. BJÖRKLUND (red.). Oxford University Press, New York.

DELIAGINA T. G., ORLOVSKY G.N., PAVLOVA G. A. 1983. *The capacity for generation of rhythmic oscillations is distributed in the lumbosacral spinal cord of the cat.* Exp. Brain Res. 53, 81–90.

FERABOLI-LOHNHERR D., SŁAWIŃSKA U., ORSAL D., GIMNEZ Y RIBOTTA M., PRIVAT A. 1996. *Chronologie des récupérations motrices chez le rat adulte spinal chronique, apr,s transplantation de neurones embryonnaitres dans la moelle éini,re sous-lesionnelle.* XIII Annual Symposium of Locomotor Club. Marseille 3–4 Oct 1996 (po francusku)

FERABOLI-LOHNHERR D., SŁAWIŃSKA U., ORSAL D., GIMNEZ Y RIBOTTA M., PRIVAT A. 1996. *Evolution temporelle de la récupération de la locomotion chez le rat adulte spinal chronique, apr,s transplantation de neurones embryonnaires dans la moelle épini,re sous-lésionnelle.* Club du Motoneurone. Societe des Neurosciences. Marly-le-Roi. 29 Nov-1–Dec 1996 (po francusku)

FERABOLI-LOHNHERR G., ORSAL D., YAKOVLEFF a., GIMENEZ Y RIBOTTA M., PRIVAT A. 1997. *Recovery of locomotor activity in the adult chronic spinal rat after sublesional transplantation of embryonic nervous cells: Specific role of serotonergic neurons.* (w przygotowaniu)

FOSTER G. A., ROBERTS M. H. T., WILKINSON L. S., BJÖRJKUND A., GAGE F.H., HÖKFELT T., SCHULTZBERG M., SHARP T. 1989. *Structural and functional analysis of raphe neurone implants into denervated rat spinal cord.* Brain Res. Bull. 22, 131–137.

FUNG S. J., BARNES C. D. 1981. *Evidence of facilitatory coerulo-spinal action in lumbar motoneurones of cats.* Brain Res. 216, 299–311.

GAGE F. H., KAWAJA M. D., FISHER L. J. 1991. *Genetically modified cells: Applications for intracerebral grafting.* TINS 14, 328–333.

GOLDBERGER M.E., BREGMAN B., VIERCK J., BROWN M. 1990. *Criteria for assessing recovery of function after spinal cord injury: Behavioral methods.* Exp. Neurol. 107, 113-117.

GOLDBERGER M. E. 1977. *Locomotor recovery after unilateral hindlimb deaferentation in cats.* Brain Res. 123, 59-74.

GOLDBERGER M. E. 1988a. *Spared-root deafferentation of a cat's hindlimb: Hierarchical regulation of pathways mediating recovery of motor behavior.* Exp. Brain Res. 73, 329–342.

GOLDBERGER M. E. 1988b. *Partial and complete deafferentation of cat hindlimb: The contribution of behavioral substitution to recovery of motor function.* Exp. Brain Res. 73, 343–353.

GRILLNER S. 1975. *Locomotion in vertebrates: central mechanisms and reflex interaction.* Physiol. Rev. 55, 247–304.

GRILLNER S., SHIK M.L. 1973. *On the descending control of the lumbosacral spinal cord from the "mesencephalic locomotor region".* Acta Physiol. Scand. 87, 320–333.

HASHIMOTO T., FUKUDA N. 1991. *Contribution of serotonin neurons to the functional recovery after spinal cord injury.* Brain Res. 539, 263–270.

HERMAN J.P., ABROUS N. D. 1994. *Dopaminergic grafts after fifteen years: results and perspectives.* Prog. Neurol. 44, 1–35.

HERMAN J.P., CHOULLI K., LE MOAL M. 1985. *Activation of striatal dopaminergic grafts by haloperidol.* Brain Res. Bull. 15, 543–547.

MADRAZO I., DRUCKER-COLLIN R., DIAZ V., MARTINEZ-MATA J., TORRES C., BECERRIL J. J. 1987. *Open microsurgical autograft of adrenal medula to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease.* New Engl. J. Med. 316, 831–834.

MAXWELL D. J., FOSTER G. A. 1991. *Immunoelectron microscopic analysis of the synaptic connectivity of serotoninergic neurones grafted to the 5,7-dihydroxytryptamine-lesioned rat spinal cord.* Neuroscience 45, 307–321.

RAJAOFETRA N., KONING N., POULAT P., MARLIER L., SANDILLON F., DRIAN M. J. GEFFARD M., PRIVAT A. 1992. *Fate of B1-B2 and B3 rhombencephalic cells transplanted into the transected spinal cord of adults rats: light and electron microscopic studies.* Exp. Neurol. 117, 59–70.

RIDDOCH G. 1917. *The reflex functions of the completely divided spinal cord in man, compared with those associated with less severe injury.* Brain 40, 264–402.

ROBINSON G. A., GOLDBERGER M. E. 1986. *The development and recovery of motor function in spinal cats. I. The infant lesion effect.* Exp. Brain Res, 62, 373–387.

ROSSIGNOL S. 1996. *Neural control of stereotypic limb movements.* [W:] J. SMITH, J. DEMPSEY, J. JOHNSON, P. WAGNER, R. TERJUNG (red.) *Integration of motor, circulatory, respiratory and metabolic control during exercise.* Handbook of American Physiological Society.

SAKAI Y., IWATA N., AOSHIMA S. 1973. *Effects of L-dopa α-and γ-motor system.* Folia Pharmacol. Jpn. 69, 467–482.

SHERRINGTON C. S. 1910. *Flexion reflex of the limb, crossed extension reflex and reflex of stepping and standing.* J. Physiol. (London) 40, 28–121.

SŁAWIŃSKA U., MAJCZYŃSKI H. 1997a. *Recovery of motor function in adult spinal rats after transplantation of embryonic raphe nucleus into the spinal cord below the transection.* XI World Congress of the International Society for Artificial Organs. Providence, Rhode Island, USA, June 29–July 1.

SŁAWIŃSKA U., MAJCZYŃSKI H. 1997. *Partial restoration of hindlimb function in adult spinal rats after transplantation of embryonic raphe nucleus into the spinal cord below the transection.* III International Congress of the Polish Neuroscience Society, Łódź 7–10 September

STEINBUSCH H. W. M. 1984. *Serotonin-immunoreactive neurones and their projections in the CNS.* [W:] A. BJÖRKLUND, T. HÖKFELT i M. J. KUHAR (red.) *Handbook of chemical neuroanatomy.* t. 3. Amsterdam, Elsevier 68–125.

STRECKER R. E., SHARP T., BRUNDIN P., ZETTERSTRÖM T., UNGERSTEDT U., BJÖRKLUND A. 1987. *Autoregulation of dopamine release and metabolism by striatal nigral grafts as revealed by intracerebral dialysis.* Neurosc. 22, 169–178.

STRÖMBERG I., VAN HORNE C., BYGDEMAN M., WEINER N., GERHARDT G. A. 1991. *Function of intraventricular human mesencephalic xenografts in immunosuppressed rats: an electrophysiological and neurochemical analysis.* Exp. Neurol. 112, 140–152.

THOMPSON G. 1890. *Succesfull brain grafting.* N. Y. Med. J. 51, 701–702

YAKOVLEFF A., ROBY-BRAMI A., GUEZARD B., MANSOUR H., BUSSEL B., PRIVAT A. 1994. *Locomotion in rats transplanted with noradrenergic neurons.* Brain Res. Bull. 22, 115–121.