

ARTUR CZUPRYN

*Zakład Neurobiologii Molekularnej i Komórkowej
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego
Polska Akademia Nauk
Pasteura 3, 02-093 Warszawa
E-mail: artur@nencki.gov.pl*

TERAPIE KOMÓRKOWE A PREKURSORY NEURALNE W MÓZGU DOROSŁYCH SSAKÓW*

WSTĘP – TERAPIE KOMÓRKOWE

Co łączy Supermana, prezydenta Stanów Zjednoczonych Ronalda Regana, papieża Jana Pawła II czy choćby najbardziej znanego baseballistę w historii tego sportu Lou Gehriga? Poza tym, że są powszechnie znani we współczesnym świecie, wiąże ich również fakt, że cierpieli na choroby neurodegeneracyjne i nawet dostępne dla nich, najnowocześniejsze strategie medyczne nie potrafiły skutecznie zaradzić zmianom zachodzącym w ich ośrodkowym układzie nerwowym (OUN). Znany aktor, Christopher Reeve¹, wcielający się w rozpoznawalne role superbohatera, filmowego Supermana, po upadku z konia doznał poważnego uszkodzenia rdzenia kręgowego i w wyniku postępującej degeneracji zmarł. Ronald Regan był przykładem osoby cierpiącej długie lata na zespół Alzheimera, zaś Karol Wojtyła – chorobę Parkinsona. Wreszcie wspaniała sportowa kariera Henry'ego Louis „Lou” Gehriga została przerwana przez dramatycznie postępującą degeneracyjną chorobę rdzenia kręgowego, stwardnienie zanikowe boczne (ang. amyotrophic late-

ral sclerosis, ALS), określane także mianem choroby Lou Gehriga.

Naprawa uszkodzeń i chorób ośrodkowego układu nerwowego stanowi jedno z większych wyzwań współczesnej medycyny i nauk przyrodniczych. Istnieje cały szereg zaburzeń, z którymi wciąż nie umiemy sobie poradzić. Są to głównie udary mózgu, urazowe (mechaniczne) uszkodzenia mózgu i rdzenia kręgowego oraz uszkodzenia spowodowane powstawaniem i rozrastaniem się nowotworów. Liczną grupę uszkodzeń stanowią choroby neurodegeneracyjne, które mogą dotyczyć całych obszarów, jak w chorobie Alzheimera, albo wywoływać śmierć tylko specyficznych rodzajów komórek wśród rzeszy innych funkcjonujących prawidłowo, jak w chorobie Parkinsona. Staramy się stosować różne strategie naprawcze, zarówno operacyjne, jak i farmakologiczne. Natomiast szczególnie obiecujący kierunek wskazują szeroko rozumiane terapie komórkowe. Mogą być one prowadzone zarówno według strategii operacyjnej, jak i farmakologicznej, a także przy połączeniu obu podejść.

Celem strategii komórkowych może być, po pierwsze, przeciwdziałanie obumieraniu istniejących już komórek: neuronów i komórek glejowych. Ale to także terapie polegające na zwiększaniu liczby nowych komórek. W tym drugim przypadku, terapie mogą polegać na podawaniu zawiesin komórkowych,

¹Warto wspomnieć, że zapoczątkowana przez niego i jego żonę fundacja Christopher and Dana Reeve Foundation włożyła ogromny wkład w rozwój nowoczesnych eksperymentalnych i klinicznych strategii naprawy mózgu oraz rdzenia kręgowego, zwłaszcza terapii komórkowych z użyciem komórek macierzystych.

Słowa kluczowe: neurogeneza w dojrzałym mózgu, neuralne komórki macierzyste, progenitory, przeszczepy, uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego

*Praca powstała przy częściowym wsparciu finansowym ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju z grantu Strategmed konsorcjum Regennova STRATEGMED1/235077/9/NCBR/2014 oraz ze środków Narodowego Centrum Nauki z grantu DEC-2012/07/B/NZ4/01733.

np. bezpośrednio do miejsca uszkodzenia, otoczenia uszkodzenia albo w podaniu systemowym do krwioobiegu. Z drugiej strony, mogą polegać na skutecznym mobilizowaniu własnych komórek prekursorowych znajdujących się w organizmie do udziału w bezpośrednich procesach naprawy lub do zmniejszania skutków uszkodzeń.

Oczywiście, odpowiednie, nowe komórki można próbować fizycznie dostarczyć do miejsca docelowego pacjenta cierpiącego na takie niedobory, należy jednak pamiętać, by samo ich podawanie powodowało jak najmniejsze uszkodzenia. Takie strategie można by nazwać naprawami przy zastosowaniu komórek „zewnętrznych” (egzogennych). Jednak większym wyzwaniem są terapie naprawcze, w których w różnych obszarach mózgu i rdzenia kręgowego, a także innych organach (np. szpik kostny), aktywuje się komórki istniejące już w organizmie pacjenta lub gospodarza (komórki endogenne). Umożliwiałyby one bądź bezpośrednio działanie terapeutyczne, np. uzupełnianie brakujących populacji neuronów, bądź pośrednio stymulowały układ nerwowy do przeciwdziałania skutkom udaru, uszkodzeń komórkowych lub chorób neurodegeneracyjnych.

W badaniach przedklinicznych stosuje się szerokie spektrum strategii poznawczych, a na ich podstawie eksperymentalnych terapii naprawczych. Niniejsza praca stanowi przegląd wyłącznie niektórych, bardziej obiecujących kierunków zwiększania liczby nowych komórek w naprawie uszkodzeń OUN, zwłaszcza mózgu. Duże nadzieje wiąże się z opisaniem miejsc w mózgu dorosłych ssaków, w tym człowieka, gdzie mimo zakończenia procesów rozwojowych nie ustają podziały prekursorów komórkowych i zachodzi tzw. neurogenезa w dojrzałym mózgu (ang. adult neurogenesis). Umiejętne wykorzystanie podziałów prekursorów mogłoby służyć w terapiach bezpośredniego zaangażowania komórek endogennych lub po ich izolacji z tych ograniczonych regionów, w strategiach eksperymentalnych i przeszczepieniu do miejsc dotkniętych uszkodzeniem. Zapoznam czytelnika z trudnościami naprawy uszkodzeń mózgu oraz zjawiskami powstawania nowych neuronów w mózgu dorosłych zwierząt i ludzi w stanie fizjologicznym i w sytuacji uszkodzenia mózgu. Omówione będą także niektóre aspekty potencjalnie możliwego wykorzystania prekursorów w strategiach naprawczych. Przedstawię również wybrane terapie z zastosowaniem przeszczepów innych, mniej typowych prekursorów neuronów i gleju obecnych w mózgu w naprawie uszkodzeń mózgu i rdzenia kręgowego.

DLACZEGO TAK TRUDNO NAPRAWIĆ USZKODZENIA W MÓZGU I RDZENIU KRĘGOWYM?

Trudności naprawy uszkodzeń mózgu i rdzenia kręgowego wynikają z dużej liczby typów neuronów i komórek glejowych oraz ich wyjątkowo wąskiej specjalizacji w funkcjonalnych sieciach/zespołach komórkowych odpowiedzialnych za pojedyncze, często unikatowe procesy.

W mózgu występuje olbrzymia liczba neuronów oraz towarzyszących im komórek glejowych. Na podstawie szczegółowych pomiarów reprezentatywnych obszarów metodami stereologicznymi, czyli uzyskiwaniem danych o trójwymiarowej strukturze na podstawie analizy próbek dwuwymiarowych, wyliczono, że u ssaków wartości te wynoszą: około 70 mln neuronów u myszy, 760 mln u kota i aż 86000 mln (czyli 86 mld; $8,6 \times 10^{10}$) u człowieka (AZEVEDO i współaut. 2009, HERCULANO-HOUZEL i współaut. 2015). Liczba połączeń nerwowych jest jeszcze większa; pojedyncze neurony mogą tworzyć 1000, a nawet 10 000 połączeń, zaś w badaniach u wymienionych gatunków oszacowano łączną liczbę synaps: u myszy na około 10^{11} , około 10^{13} u kota i aż 10^{14} – 10^{15} u człowieka. W mózgu oprócz neuronów znajdują się liczne komórki glejowe; przyjmuje się, że jest ich ponad 10–50-krotnie więcej niż neuronów. Komórki glejowe w OUN, wśród których wyróżniamy też szereg głównych typów (oligodendrocyty, astrocyty, ependymocyty i mikroglej) oraz ich podtypów, w różnorodny sposób wpływają na podgrupy neuronów i siebie same, choćby z racji bardzo zróżnicowanego pochodzenia embrionalnego. Jak widać, istnieje olbrzymia sieć zależności i skomplikowania różnych funkcjonalnych połączeń komórkowych. Jednocześnie każdego dnia w naturalnym procesie obumierania komórek człowiek traci, według szacunków, nawet 85000 neuronów dziennie – jest to proces normalny, fizjologiczny i raczej nieunikniony (HERCULANO-HOUZEL i współaut. 2015). Zatem sieć połączeń neuronalnych musi być dynamiczna i charakteryzować się zdolnością do adaptacji. Procesy uczenia się i pamięci, które są jednymi z podstawowych funkcji mózgu, opierają się właśnie na tej dynamicznej zmienności połączeń, w zależności od doświadczenia nabywanego przez zwierzę czy człowieka (BAILEY i współaut. 2015).

W mózgu występuje wiele wyspecjalizowanych klas neuronów, różnorodnych pod względem budowy, tworzonych połączeń synaptycznych, uwalnianych neurotransmiterów, jak i charakterystyki odpowiedzi elektrofizjologicznej w reagowaniu i przekazywa-

niu (bądź hamowaniu) pobudzenia synaptycznego. Hiszpański neuroanatom Santiago Ramón y Cajal (lata 1852-1934) włożył olbrzymi wkład w opisanie różnorodności komórek nerwowych, zwłaszcza w mózgu. Szereg jego pionierskich, ale jednocześnie systemowych i skrupulatnych obserwacji mikroskopowych pozwoliło poznać złożoność budowy różnych struktur mózgu na poziomie komórkowym. W uznaniu zasług nad badaniem układu nerwowego w 1906 r. uhonorowany został Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii/medycyny, dzieloną z Camillo Golgim, którego technika barwienia preparatów histologicznych oraz własne obserwacje biostruktury układu nerwowego również przyczyniły się do opisanie komórkowej budowy mózgu). Wiele obserwacji Ramón y Cajala jest aktualnych do dzisiaj, a odrębne rysunki nie ustępują precyzją szeregowi zdjęć struktur anatomicznych otrzymywanych nowoczesnymi technikami obrazowania. Skala skomplikowania budowy mózgu i rdzenia kręgowego oraz ścisłego wyspecjalizowania różnorodnych populacji neuronów i komórek glejowych, to powód trudności przy ich naprawie i próbach odtwarzania sieci unikatowych połączeń. Dodatkowo towarzyszą temu wspomniane już naturalne procesy zmieniania struktury połączeń w zależności od naszych doświadczeń.

Przy olbrzymich zasługach i wkładzie Ramón y Cajala w stan wiedzy o OUN, był on jednocześnie twórcą powszechnego przekonania, że skoro nie widać dzielących się komórek nerwowych, to mózg i rdzeń kręgowy nie są zdolne do regeneracji (RAMÓN Y CAJAL 1913). Dogmat ten pokutował w neurobiologii przez prawie całe stulecie. Nie zmieniły go badania Josepha Altmana z Massachusetts Institute of Technology (ALTMAN 1962, 1963; ALTMAN i DAS 1965) wskazujące, że istnieją obszary, w których pojawiają się nowe neurony z lokalnych prekursorów włączających podczas podziałów komórkowych znakowane izotopowo substraty dla syntezy DNA. Dopiero w latach 90. ubiegłego wieku, po publikacjach zespołów Freda Gage'a i Arturo Alvarez-Buylla, zwrócono uwagę na fakt, że neurogeneza nie musi być ograniczona do okresu rozwojowego w zarodku i krótkiego czasu po narodzeniu (GAGE 2000, ALVAREZ-BUYLLA i GARCIA-VERDUGO 2002). Jednak zdolności samoregeneracji mózgu i rdzenia kręgowego, nawet w uszkodzeniach zachodzących lokalnie, są dużo słabsze niż w organach takich jak wątroba, skóra czy jelita. Nie zapewniają one pełnego odtworzenia tkanki i jej funkcji sprzed uszkodzeń urazowych czy chorób neurodegeneracyjnych.

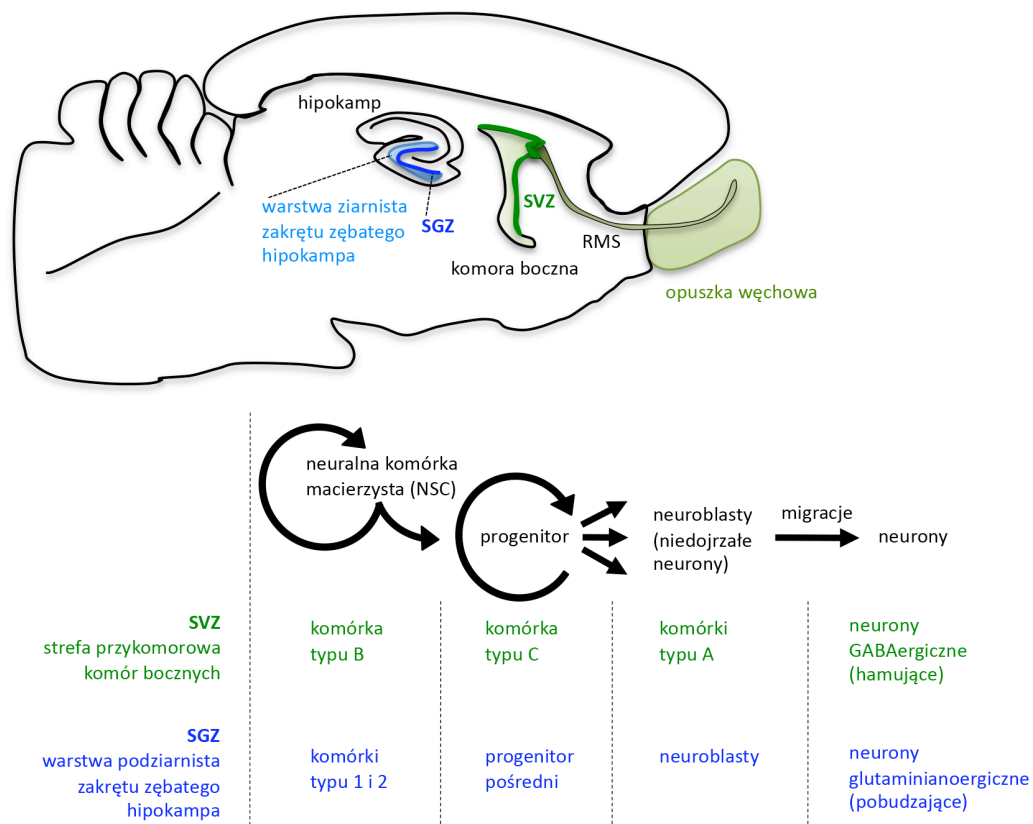
OGRANICZONE „SAMOODTWARZANIE SIE” W MÓZGU DOROSŁYCH SSAKÓW I CZŁOWIEKA

Do niedawna funkcjonujące przekonanie, że ośrodkowy układ nerwowy ssaków jest pozbawiony mechanizmów naprawczych, nie jest do końca prawdziwe. Prace z końca ubiegłego wieku dostarczyły mocnych dowodów na powstawanie neuronów, czyli neurogenezę, w dojrzałym mózgu. W mózgu bez uszkodzeń zjawisko to jest ściśle ograniczone do zaledwie kilku obszarów (por. MING i SONG 2011). Jednym z nich jest cienka warstwa wyścielająca ściany komór bocznych mózgu, zwana strefą przykomorową (ang. subventricular zone, SVZ), drugą jest warstwa podziarnista (ang. subgranular zone, SGZ) w hipokampie, dokładnie w jego części zwanej zakrętem zębatym (Ryc. 1). W tych regionach znajdują się swoiste komórki prekursorowe, a ponieważ są one źródłem wyłącznie komórek występujących w układzie nerwowym (neuronów, rzadziej gleju), określane są mianem prekursorów neuralnych zaliczanych do grupy tkankowo-specyficznych komórek macierzystych u dorosłych ssaków (podobnie jak komórki macierzyste hematopoetyczne, mezenchymalne i inne).

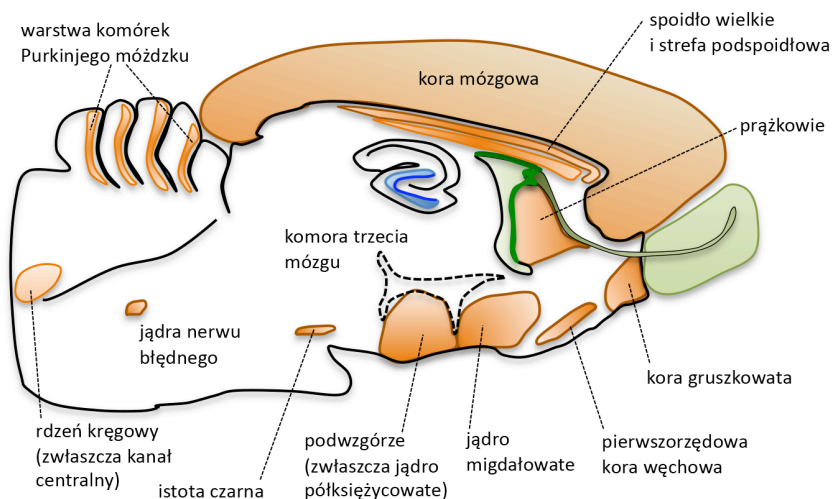
Należy podkreślić, że w wymienionych miejscach neurogennych występują dwa rodzaje komórek prekursorowych (SEABERG i VAN DER KOOT 2003, DE FILIPPIS i BINDA 2012). Pierwsze z nich to neuralne komórki macierzyste (ang. neural stem cells, NSC), prekursorzy pierwszego rzędu. W wyniku asymetrycznych podziałów mitotycznych dają one jednocześnie dwa rodzaje komórek potomnych: komórki zachowujące fundamentalny status samoodnawiania się („odtworzenie” NSC) oraz komórki prekursorowe drugiego rzędu nazywane progenitorami². W sytuacji fizjologicznej, w mózgu bez uszkodzeń, NSC dzielą się niezwykle rzadko, pozostają w stanie częściowego uśpienia przez całe dorosłe życie ssaków, w tym człowieka. Mają dwie cechy powszechnie uznawane za wyznaczające macierzystość: zdolność do samoodtworzenia oraz własności multipotencjalne, czyli możliwość inicjowania powstania różnych typów komórek w ramach jednego rodzaju tkanki, w tym przypadku neuronów i komórek glejowych (w tym także astrocytów i oligodendrocytów). NSC w obu obszarach wykazują bardzo duże podobieństwo do gle-

²Można zaznaczyć, że nazewnictwo tych dwóch rodzajów komórek nawet w literaturze fachowej niejednokrotnie jest mylone. Częstym, a niesłusznym uproszczeniem jest nazywanie obu rodzajów komórek wymiennie terminami: neuralne komórki macierzyste, progenitory. Natomiast cytowane prace dotyczą właśnie usystematyzowania tego nazewnictwa i określenia cech charakterystycznych obu populacji komórkowych (SEABERG i VAN DER KOOT 2003, DE FILIPPIS i BINDA 2012).

A. Nisze neurogenne w mózgu dorosłych ssaków



B. Obszary w mózgu dorosłych ssaków, w których prekursorzy (miejscowe lub napływające z innych regionów) pod wpływem indukcji tworzyli neurony lub astrocyty lub oligodendrocyty



Rycina 1. Obszary mózgu u dorosłych ssaków (na przykładzie schematu przekroju mózgu myszy lub szczurów laboratoryjnych), w których obecne są prekursorzy neuralne: A. w niszach neurogennych w stanie fizjologicznym; pokazano porównanie różnych typów komórek w obu niszach neuralnych, RMS – doopuszkowy strumień migracyjny; B. po indukcji wywołanej uszkodzeniem (np. w korze mózgowej) lub stymulacją (np. w podwzgórzach) (wg GOULD 2008, zmodyfikowana).

ju promienistego lub są wprost traktowane jako glej promienisty, podklasa astrocytów (SERI i współaut. 2001, DOETSCH i współaut. 1999) i będą szczegółowo scharakteryzowane w następnym rozdziale. Taką klasyfikację przyjęto ze względu na: 1) ich spolaryzowaną morfologię ze znamioną długą wypustką, 2) obecność białek charakterystycznych dla astrocytów (których detekcja jako tzw. białek znacznikowych może być sposobem identyfikacji w niszy neurogennej), w tym przede wszystkim glejowego kwaśnego białka włókienkowego (ang. glial fibrillary acidic protein, GFAP), 3) zdolność do proliferacji prowadzących do powstawania neuronów. W strefie przykomorowej zwane są komórkami typu B (Ryc. 1), zaś w zakręcie zębatym hipokampa określane są mianem komórek typu 1 i 2, gdzie oba typy mają pokrój komórki podobnej do gleju promienistego, ale tylko typ 1 wykazuje obecność białka GFAP (MING i SONG 2011). Z kolei powstające z NSC progenitory charakteryzują się wysoką aktywnością podziałową, jednak tylko w ograniczonym czasie, tj. przechodzą ograniczoną liczbę podziałów komórkowych. W wyniku tego powstają progenitory potomne oraz niedojrzałe neurony (neuroblasty), rzadziej komórki o charakterze gleju. W strefie przykomorowej intensywnie dzielące się progenitory określane są jako komórki typu C, zaś w SGZ jako progenitory pośrednie (Ryc. 1). Neuroblasty sukcesywnie opuszczają niszę neurogenną i mogą przemieszczać się na różne odległości, przechodzą procesy różnicowania do dojrzałych neuronów i ostatecznie włączają się funkcjonalnie do istniejących sieci neuronalnych.

Migracje neuroblastów i rodzaje powstających neuronów oraz ich funkcje znacząco różnią się w przypadku obu miejsc neurogennych. U gryzoni i większości ssaków neuroblasty z SVZ oddzielnie w każdej z półkul mózgowych tworzą charakterystyczny ciąg przemieszczających się komórek, który można określić jako doopuszkowy strumień migracyjny (w literaturze anglojęzycznej funkcjonujący jako rostral migratory stream³, RMS), gdyż miejscem docelowym ich zorganizowanej migracji jest znajdująca się w bardzo dużej odległości opuszka węchowa. Trwająca około 2-4 tygodni wędrów-

ka nie zachodzi wzdłuż anatomicznie rozróżnialnej struktury, a wydaje się być regulowana przez dynamiczne interakcje migrujących neuroblastów z drobnymi naczyniami krwionośnymi, otaczającymi astrocytami i wydzielanymi przez nie czynnikami, zwłaszcza poprzez neurotroficzny czynnik pochodzenia mózgowego (ang. brain-derived neurotrophic factor, BDNF) (SNAPYAN i współaut. 2009). Docierając do rdzenia opuszki węchowej neuroblasty rozchodzą się następnie promieniście do poszczególnych jej warstw i przechodzą ostateczne różnicowanie w interneurony hamujące różnych podrodzajów. W ten sposób tworzone są głównie neurony GABAergiczne, zawierające jako neurotransmitter kwas γ -aminomasłowy, w tym podklasy kalbindynowe i kalretyninowe, a w mniejszym stopniu neurony dopaminergiczne (MING i SONG 2011). Z kolei neuroblasty powstające w warstwie komórek podziarnistych hipokampa wykonują krótkodystansowe migracje, obrazowo opisane terminem „wspinaczki”, po długich wypustkach neuralnych astrocytopochodnych komórek macierzystych do sąsiadującej warstwy komórek ziarnistych. Neuroblasty dojrzewają w obrębie zakrętu zębatego hipokampa, a powstające w ten sposób nowe neurony mają charakter pobudzeniowy, zupełnie inny niż neurony powstające w wyniku migracji neuroblastów z SVZ do opuszki węchowej (Ryc. 1).

W ostatnich latach pojawiło się szereg doniesień pokazujących, że komórki prekursorowe w SVZ nie są jednakowe; wykazują funkcjonalne zróżnicowanie (LLEDO i współaut. 2008). W literaturze opisano silną regionalizację prekursorów, polegającą na tym, że prekursorzy z różnych przedziałów SVZ (np. z części przedniej, grzbietowej itd.) są źródłem neuroblastów, które ostatecznie dają określone podtypy interneuronów opuszki węchowej (LIM i ALVAREZ-BUYLLA 2014). Taka regionalizacja niesłaby potencjalne możliwości ukierunkowania terapii komórkowej, gdyż izolowanie prekursorów neuralnych z poszczególnych regionów SVZ umożliwiałoby po przeszczepieniu zwiększone odtwarzanie wybranej populacji neuronów.

Podsumowując, neurogeneza w dojrzałym mózgu zachodzi tylko w ograniczonych obszarach i umożliwia powstawanie tylko kilku typów neuronów. Jak wspomniano, obszary te określamy mianem nisz neurogennych, gdyż charakteryzują się obecnością szeregu wyspecjalizowanych komórek i przystosowań na poziomie strukturalnym i molekularnym. Oprócz prekursorów (NSC i progenitorów), istotną rolę pełnią tutaj także komórki wyściółki (komórki ependymalne, ependymocyty), astrocyty oraz naczynia krwionośne, białka strukturalne i sygnałowe przestrzeni

³Migracji komórkowych do rostrum, czyli w kierunku do przodu, jest w tej części komory bocznej mózgu na różnych etapach życia dużo więcej, np. strumień migracyjny skierowany do przodu z wyniosłości zwojowej, ang. rostral migration lub rostral stream, stąd warto, aby polska terminologia była jednoznaczna i możliwie łatwa. Czasami spotykane polskie tłumaczenie 'migracja donosowa' jest nieprecyzyjne lub mylące (bo nie zachodzi do nosa, tylko do opuszki węchowej), zaś 'migracja doprzodowa' lub 'migracja przodowa' jest zdecydowanie mało zręczne, natomiast 'przedni strumień migracyjny' niejednoznaczne (=1. strumień znajdujący się z przodu, =2. strumień skierowany do przodu).

międzykomórkowej. Wszystkie te elementy tworzą razem specyficzne mikrośrodowisko precyzyjnie regulujące stopień uśpienia proliferacyjnego NSC oraz intensywność szybkich podziałów progenitorów, szybkość i kierunki migracji neuroblastów oraz ich różnicowanie.

SKĄD SIĘ BIORĄ NEURALNE KOMÓRKI MACIERZYSTY I PROGENITORY W DOJRZAŁYM MÓZGU?

Aby przybliżyć istotę działania komórek prekursorowych umożliwiających powstawanie nowych neuronów w dojrzałym mózgu warto spojrzeć na komórki aktywne proliferacyjnie podczas rozwoju układu nerwowego. Są nimi przede wszystkim komórki gleju promienistego (gleju radialnego). NSC oraz progenitory w obu niszach neuralnych u dorosłych ssaków stanowią bezpośrednie lub pośrednie pozostałości gleju promienistego, który zachował aktywność proliferacyjną w tych ograniczonych obszarach mózgu.

Glej promienisty, specyficzny rodzaj astrocytów, podczas rozwoju OUN jest źródłem neuronów oraz innych typów komórek. Pełniąc także funkcje podporowe, dzięki długim wypustkom, umożliwia prawidłowe rozprzestrzenianie się nowopowstających komórek, aby osiągnęły one właściwe miejsce docelowe. Jednym z lepiej poznanych przykładów jest udział tych komórek w rozwoju zarodkowym kory mózgowej (CLOWRY i współaut. 2010). W tym przypadku ciała komórek gleju promienistego umiejscowione są w strefie komorowej (ang. ventricular zone), zaś długie wypustki rozchodzące się promieniście na zewnątrz, dochodzą aż do powierzchni nowopowstającej kory mózgowej (płytki korowej, ang. cortical plate). Z asymetrycznych podziałów gleju promienistego powstają niedojrzałe neurony i intensywnie dzielące się progenitory pośrednie, które wtórnie dają także nowe, liczne neurony. Glej promienisty uczestniczy zatem w neurogenezie. Powstające z niego bezpośrednio lub pośrednio neuroblasty wykorzystują następnie jego długie wypustki jako rusztowanie do migracji na duże odległości, do powstających w ten sposób warstw kory mózgowej (CLOWRY i współaut. 2010). Tak powstają wszystkie neurony pobudzające występujące potem w korze mózgowej dorosłych ssaków, w tym i człowieka. Na końcowych etapach rozwoju zarodkowego ssaków większość komórek gleju promienistego zmienia charakter i przemieszcza się do kory mózgowej stając się astrocytami lub komórkami aktywnie uczestniczącymi w tworzeniu gleju, inaczej glejogenezie (KRIEGSTEIN i ALVAREZ-BUYLLA 2009). Jednak po zaniknięciu strefy komorowej w okresie okołoporodowym pozostaje

jeszcze cieniutka, szczątkowa warstwa znajdująca się pierwotnie powyżej powierzchniowej części strefy komorowej, która będzie w ten sposób cienką wyściółką komór bocznych mózgu (części systemu wewnętrznych komór mózgu), zwaną strefą przykomorową. W tej warstwie, oprócz gęsto upakowanych komórek epitelialnych (ependymocytów), znajdują się glejopochodne komórki macierzyste (ALVAREZ-BUYLLA i GARCIA-VERDUGO 2002) opisane powyżej jako NSC. Wykazano zatem, że glej promienisty ma nie tylko własności prekursorowe, pełni role unipotentnych lub multipotentnych komórek macierzystych, umożliwiając powstawanie nowych neuronów, ale także prekursorów oligodendrocytów (KRIEGSTEIN i ALVAREZ-BUYLLA 2009). Pokazano ponadto, że prekursor oligodendrocytów mogą również powstawać z gleju promienistego w warunkach *in vitro* (MO i ZECEVIC 2009). Glej promienisty odgrywa również kluczową rolę podczas powstawania warstw hipokampa, w tym, jest pierwotnym źródłem prekursorów komórek neuralnych warstwy podziarnistej zakrętu zębatego (PINTO i GÖTZ 2007). Również i w tym obszarze neurogennym komórki prekursorowe u dorosłych ssaków wykazują podobieństwo do komórek glejowych oraz część z nich zachowuje białko GFAP, jako charakterystyczny znacznik komórek glejowych i glejopochodnych (KEMPERMANN i współaut. 2004).

REGULACJA AKTYWNOŚCI PROGENITORÓW W DOJRZAŁYM MÓZGU A TERAPIE KOMÓRKOWE

Należy podkreślić, że w warunkach fizjologicznych w dojrzałym mózgu zdecydowana większość nowych neuronów, zarówno pojawiających się w opuszcze węchowej, jak i zakręcie zębatym hipokampa, żyje bardzo krótko i ulega naturalnej eliminacji. Tylko niektóre z nich (szacuje się, że od kilkunastu do około 50%) zastępują istniejące już starsze neurony w różnych warstwach opuszki węchowej lub w hipokampie w warstwie ziarnistej. Zjawiska te mogą być zależne od poznawania bodźców węchowych lub bodźców związanych z lokalizowaniem miejsca w przestrzeni (uczenie przestrzenne) (MING i SONG 2011). Istnieje jednak cała seria testów doświadczalnych zespołu L. Kaczmarka i R. K. Filipkowskiego pokazujących, że w dorosłych modelach mysich z upośledzoną neurogenezą nie obserwowano prawie żadnych zaburzeń uczenia przestrzennego zależnego od hipokampa (JAHOLKOWSKI i współaut. 2009). Z drugiej strony, wybiórcze usunięcie nowych neuronów po uczeniu zależnym od hipokampa, nawet po 1 mie-

siącu od treningu, powodowało zaburzenie pamięci przestrzennej (ARRUDA-CARVALHO i współaut. 2011). Wydaje się zatem, że rola nowych neuronów jest bardziej złożona niż pierwotnie sugerowano w latach 90. ubiegłego wieku, gdy badanie roli neurogenezy u dorosłych zwierząt zaczynało fascynować badaczy. Obecnie wydaje się, że dysponujemy bardziej obiektywną wiedzą dotyczącą tego zagadnienia.

Powstaje pytanie, czy aktywność progenitorów jest stała, czy może zależy od jakichś czynników? Jeśli ulega modulacjom, to istniałaby potencjalna szansa sterowania aktywnością prekursorów w uszkodzeniach OUN. Okazuje się, że aktywność neurogenezy u dorosłych zwierząt w obu obszarach neurogennych jest dynamiczna i regulowana przez wiele czynników. Na przykład, neurogenezę w hipokampie u gryzoni laboratoryjnych zwiększa trzymanie ich w środowisku bogatym w różnorodne bodźce (tzw. środowisko wzbogacone), także aktywność fizyczna i uczenie się (MING i SONG 2011). Z kolei poziom neurogenezy zmniejszają sytuacje stresowe (np. u gryzoni zapach drapieżnika), stan zapalny oraz wiek zwierząt.

Jak przedstawiono wcześniej, w sytuacji fizjologicznej, w mózgu bez uszkodzeń, NSC pozostają w stanie częściowego uspiania przez całe dorosłe życie ssaków. Jedynie ich rzadkie podziały umożliwiają tworzenie intensywnie dzielących się progenitorów, z których powstają neuroblasty różnicujące się ostatecznie do dojrzałych neuronów. Natomiast okazuje się, że w sytuacji uszkodzenia następuje znaczne uaktywnienie NSC i w rezultacie szybko proliferujących progenitorów jest dużo więcej (GOULD 2007). Wydaje się, że nisze neurogenne odpowiadają bezpośrednio na sygnały pojawiające się podczas uszkodzenia innych obszarów mózgu. W modelach epilepsji u zwierząt doświadczalnych zaobserwowano, że wpływ na aktywność proliferacyjną prekursorów jest zróżnicowany i zależy od czasu wywołania drgawek. W stanach ostrych odnotowywano wzrost poziomu neurogenezy, a w stanach przewlekłych jej zmniejszenie (ROTHENEICHNER i współaut. 2013). Co ciekawe, doświadczalne zahamowanie neurogenezy w hipokampie myszy przed rozpoczęciem indukcji stanów drgawkowych powodowało zmniejszenie częstości chronicznych drgawek. Zaskakujące jest, że efekt ten był długotrwały – zmniejszał podatność na drgawki przez prawie rok (CHO i współaut. 2015). Widać zatem dwustronną zależność: niektóre uszkodzenia/zaburzenia mózgu stymulują nisze neurogenne do zwiększonej proliferacji, jednocześnie eksperymentalne modyfikowanie działania niszy

neurogennej ma efekt terapeutyczny w doświadczalnych modelach chorobowych.

W modelach depresji poziom neurogenezy u dorosłych zwierząt był obniżony; występowanie podobnego obniżenia postuluje się też u ludzi znajdujących się w stanach depresyjnych (SCHARFMAN i HEN 2007). Interesujące jest, że zgodnie z wynikami uzyskanymi przez SCHARFMANA i HEN (2007), środki antydepresyjne powodowały zwiększenie aktywności podziałowej NSC i progenitorów. Podsumowując, różne choroby lub zaburzenia mogą znacząco zmieniać aktywność proliferacyjną w niszach neurogennych, co jest szczególnie istotne zwłaszcza w kontekście wykorzystywania NSC w terapiach komórkowych.

Rodzi się zatem pytanie, czy prekursorzy z nisz neurogennych mogą brać udział w naprawie ośrodkowego układu nerwowego? Doskonałym przykładem są doświadczenia pokazujące po raz pierwszy, że w sytuacji uszkodzenia możliwe jest pojawienie się nowych neuronów w dojrzałej korze mózgowej myszy. Wielokrotnie próbowano wykazać, że w korze mózgowej dorosłych ssaków obserwuje się naturalne (nieindukowane) powstawanie neuronów, jednak badania wykluczały takie zjawisko (ARLOTTA i współaut. 2003). Natomiast, gdy w korze mózgowej wysoce selektywnie usunięto wybrane neurony warstwy V, to po jakimś czasie zaobserwowano pojawienie się nowych komórek, które wykazywały jednoznacznie cechy młodych neuronów (MAGAVI i współaut. 2000). Co więcej, nowe neurony potrafiły wytworzyć prawidłowe, bardzo długie wypustki aksonalne z kory mózgowej do wzgórza, odtwarzając uszkodzone połączenia nerwowe. Źródłem nowych neuronów w korze były prawdopodobnie prekursorzy znajdujące się w SVZ (lub całkowicie uspione NSC znajdujące się w innych obszarach, w tym w korze mózgowej). Pojawiły się ukierunkowane migracje progenitorów stymulowanych uszkodzeniem lub tylko neuroblastów przez nie produkowanych. Mimo iż odtworzono w ten sposób nieliczne neurony, fenomen ten pokazuje jednak niezbicie, że w mózgu ssaków (gryzoni) zachodzą naturalne mechanizmy naprawcze z wykorzystaniem endogennych prekursorów. Zaobserwowanie tego zjawiska było możliwe, ponieważ uszkodzenia były specyficznym ukierunkowane na określoną podklasę neuronów, a jednocześnie wyjątkowo subtelne, gdyż reszta tkanki, ze skomplikowaną siecią innych połączeń i zależności oraz nienaruszoną przestrzenią międzykomórkową, pozostawała nieuszkodzona. W tych warunkach doświadczalnych sygnały „przywoławcze” indukowane śmiercią komórkową i wysyłane z kory mózgowej do nisz

neurogennych lub uśpionych NSC mogły być nie tylko przekazywane, ale jednocześnie była zachowana biostruktura mózgu, która w większości przypadków uszkodzeniowych jest rozlegle zmieniona. Możliwe było lokalizowanie nowych neuronów i ich nowych połączeń przy użyciu odpowiednich barwników fluorescencyjnych i technik mikroskopowych. Prawdopodobnie takie naturalne, endogenne zjawiska naprawcze mogą zachodzić w przypadku wielu, może nawet wszystkich, uszkodzeń mózgu takich jak udar czy urazy mechaniczne. Jednak skala subtelnych migracji prekursorów lub młodych neuronów jest niewspółmiernie mała w porównaniu do skali drastycznych, globalnych zmian w ognisku większości uszkodzeń. Reasumując, w pracy tej (MAGAVI i współaut. 2000) po raz pierwszy pokazano, jak w korze mózgowej endogenne komórki mogą być aktywowane do różnicowania w neurony oraz udowodniono, że procesy naprawy mogą zachodzić bez transplantacji.

W szeregu badań potwierdzono zwiększenie aktywności endogennych neuralnych komórek macierzystych przez uszkodzenia mózgu. W takich przypadkach obserwowano zwiększenie bezpośredniego napływania progenitorów z niszy neurogennej do miejsc uszkodzenia (ARVIDSSON i współaut. 2002). Podobne, w pełni instrukcyjne sygnały z miejsca uszkodzenia skutecznie otrzymywały wszczepione prekursorzy neuronalne (ARLOTTA i współaut. 2003). Jednak zarodkowe prekursorzy neuronalne i młodej neurocyty przeszczepione do mózgu bez uszkodzenia tylko częściowo odtwarzały długie połączenia typowe dla struktur przyjmujących przeszczep, a w większości były to połączenia o nieprawidłowej organizacji przestrzennej (MAGAVI i LOIS 2008). Zatem badania te wskazują, że dopiero uszkodzenie wytwarza odpowiednie mikrośrodowisko, zarówno dla endo-, jak i egzogennej prekursorów neuralnych i niedojrzałych neuronów, i umożliwia pojawianie się nowych neuronów w obszarach, w których normalnie się ich nie obserwuje, np. w korze mózgowej.

Powstaje więc pytanie, w jakich obszarach mózgu w warunkach po uszkodzeniu obserwuje się nowe neurony poza niszami neurogennymi? Ta, zachodząca wprawdzie na niewielką skalę, tzw. neurogeneza indukowana uszkodzeniem oraz powstawanie innych typów komórek (astrocytów i oligodendrocytów) z lokalnych lub przemieszczających się prekursorów, zostały wykazane w wielu regionach (Ryc. 1B). Zachodzi ona nie tylko we wspomnianej korze mózgowej, ale także w prążkowiu, jądrze migdałowatym, istocie czarnej, podwzgórzu, korze gruszkowatej, pierwszorzędowej korze węchowej czy

w jądrach nerwu błędnego (GOULD 2007). Opisano również obecność endogennej prekursorów neuralnych w rdzeniu kręgowym (QIN i współaut. 2015). Wydaje się, że w regionach tych komórki prekursorowe są trudne do zidentyfikowania, gdyż bardzo rzadko przechodzą podziały mitotyczne. Nie można też wykluczyć zjawiska nakładającej się tutaj programowanej śmierci komórkowej. Jednak jest coraz więcej dowodów, że zwłaszcza indukowana neurogeneza zachodzi w obszarach traktowanych do niedawna jako regiony nieneurogenne. W takich stanach, z racji możliwego pojawiania się niewielkiej liczby nowych neuronów, nie są one zdolne do efektywnej naprawy skutków dużych uszkodzeń, a więc nie obserwuje się przywracania globalnych funkcji tych regionów w różnych modelach uszkodzeń. W myśl wcześniej przedstawionych wyników badań wydaje się, że takie procesy naprawcze na poziomie komórkowym zachodzą, są jednak zdecydowanie niewystarczające dla efektywnej naprawy uszkodzeń. Ciekawym przykładem proliferacji i reorganizacji komórkowych indukowanych uszkodzeniem są badania grupy V. Gallo, pokazujące nietypowe przekształcenie neuroblastów w inne typy komórek, a także ich udział w modelu komórkowej terapii naprawczej. Neuroblasty migrujące normalnie z SVZ do opuszki węchowej mogą w modelu uszkodzenia osłonek mielinowych neuronów zbaczać do spoidła wielkiego (włókien aksonalnych łączących obie półkule mózgu) i przekształcać się w wyniku tej indukcji w oligodendrocyty (JABLONSKA i współaut. 2010).

Postuluje się także, że różne typy komórek, głównie komórki glejowe, które nie mają własności neurogennej, mogą w pewnych warunkach nabywać potencjał do tworzenia neuronów. Przykładem są doświadczenia z dostarczaniem astrocytom czynników transkrypcyjnych *Ascl1*, *Sox2*, *Pax6* (przegląd kilku podejść eksperymentalnych w pracy HUNANG i TAN 2015). Na tej podstawie wydaje się być słusznym pogląd, że neuralne komórki macierzyste mają szereg molekularnych cech wspólnych z astrocytami obecnymi w miejscach nieneurogennej (KRIEGSTEIN i ALVAREZ-BUYLLA 2009). Innym przykładem jest „przesterowanie” NSC i progenitorów pochodzących z hipokampa do oligodendrocytów, co umożliwiło mielinizację w modelu uszkodzenia mózgu (BRAUN i współaut. 2015). Prawdopodobnie w komórkach pobranych z dojrzałego mózgu powielane są programy komórkowe zachodzące podczas rozwoju. Takie podejście eksperymentalne, polegające na uaktywnianiu nieczynnych już szlaków rozwojowych, wydaje się być nową strategią terapii naprawczej. Ciekawy przegląd różnych

strategii, w tym przeprogramowywanie neuronów dopaminergicznych *in vitro* i *in vivo*, dostarcza praca CHEN i współaut. 2015.

TERAPIE OPARTE NA PRZESZCZEPIANIU PREKURSORÓW I MŁODOCIANYCH NEURONÓW

Terapie oparte na przeszczepieniu egzogennych komórek miałyby na celu umożliwić bezpośrednie działania naprawcze, np. uzupełnianie brakujących populacji neuronów, astrocytów, oligodendrocytów. Po drugie, mogłyby być kierowane na uzyskanie wpływu modulującego aktywność mechanizmów endogennych, np. stymulować endogenne NSC lub progeniotory, wpływać na czynność komórek glejowych stymulując je do wydzielania czynników troficznych lub modulować stan zapalny, choćby przez interakcje z mikroglejem lub uwalniając substancje aktywne: interleukiny, czynniki wzrostowe itd. Możliwa jest rekrutacja endogennych komórek macierzystych lub zastosowanie egzogennych komórek macierzystych.

W terapiach komórkowych za pomocą przeszczepów/mikroiniekcji spełnić należy kilka warunków, którymi są: właściwy dobór podawanych komórek, wydajność przeżycia podawanych komórek, właściwe różnicowanie (balansowanie pomiędzy wewnątrzkomórkowymi zaprogramowanymi scenariuszami różnicowania komórek-dawców a modulującym wpływem warunków miejsca przeszczepu) oraz skuteczne (funkcjonalne) włączanie egzogennych komórek w sieci neuronalne i sieci zależności międzykomórkowych w tkance biorców.

Próby eksperymentalne zastosowania NSC prowadzono na zwierzęcych modelach uszkodzeniowych lub zwierzęcych modelach chorób neurodegeneracyjnych człowieka, takich jak: choroba Alzheimer, choroba Parkinsona, stwardnienie rozsiane, stwardnienie zanikowe boczne, uszkodzenia rdzenia kręgowego, urazowe uszkodzenie mózgu, udary (MADHAVAN i COLLIER 2010, YONEYAMA i współaut. 2011). Komórki uzyskiwane do tych przeszczepów pochodziły z organów zarodkowych: ze szpiku, krwi pępowinowej i z rozwijającego się układu nerwowego. Po ich zastosowaniu widziano efekty na poziomie komórkowym, opisywano działanie neuroprotektoryjne lub stymulowanie lokalnej neurogenezy, jednak większych zmian funkcjonalnych, zwłaszcza na poziomie organizmu nie można było zaobserwować. Są to jednak obiecujące badania, gdyż zaobserwowano przeżywanie i różnicowanie części przeszczepionych komórek. W tkance biorców stwierdzono zmiany poziomu czynników neurotroficznych oraz neuroprotektoryjnych, takich

jak: BDNF, czynnik wzrostu nerwów (ang. nerve growth factor, NGF), glejopochodny czynnik neurotroficzny (ang. glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF), czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. vascular endothelial growth factor, VEGF) i szeregu innych. W niektórych badaniach obserwowano odtwarzanie uszkodzonej tkanki i regenerację funkcjonalną. Przykładem mogą być prace z wykorzystaniem zarodkowych komórek macierzystych w naprawie populacji komórek dopaminergicznych w modelach choroby Parkinsona opublikowane przez THOMPSONA i BJÖRKLUNDA (2015). Ludzkie zarodkowe komórki macierzyste przechodziły właściwe różnicowanie do kilku podklas neuronalnych i odtwarzały długie połączenia aksonalne.

Ciekawe wyniki integracji nowych komórek dostarczyły badania dotyczące indukowanej aktywacji własności proliferacyjnych przez rzęskowy czynnik wzrostu (ang. ciliary neurotrophic factor, CNTF) w okolicach trzeciej komory mózgu u myszy (KOKOEVA i współaut. 2005). Powodowało to obniżenie masy ciała otyłych myszy, któremu towarzyszyła indukcja podziałów komórkowych w centrum regulacji głodu i sytości, a w rezultacie powstawanie nowych neuronów. Wydaje się, że w podwzgórzu występuje pula rozproszonych NSC, które w warunkach natywnych są całkowicie lub prawie całkowicie uśpione pod względem proliferacyjnym, zaś aktywują je czynniki takie jak CNTF. Obniżenie masy ciała myszy było trwałe mimo odstawienia CNTF, zatem sugerowano, że indukowana proliferacja lokalnych prekursorów uzupełniła braki neuronalne. Wykazano, że komórki izolowane z podwzgórza zarodków (NSC, progeniotory i młodociane neurony) i przeszczepione w niewielkiej liczbie do podwzgórza zwierząt cierpiących na genetyczne zaburzenia regulacji metabolizmu, dużą otyłość i cukrzycę, umożliwiają wyraźną poprawę wynikającą z funkcjonalnej integracji nowych neuronów do sieci neuronalnych biorcy przeszczepów (CZUPRYN i współaut. 2011). Jest to jeden z pierwszych przykładów pokazujących, że nawet niewielka liczba przeszczepionych komórek, ale precyzyjnie umiejscowionych w małych jądrach podwzgórza, jest w stanie zmienić funkcje całego organizmu. Wykazano, że ze znakowanych przeszczepionych komórek odtwarzane są liczne populacje różnych klas neuronalnych oraz tworzą one synapsy z komórkami biorcy. Co więcej wykazano, że wytworzone neurony mają prawidłowe parametry odpowiedzi elektrofizjologicznych, poprawnie reagują na symulacje naśladujące krytyczne sytuacje w centrum regulacji metabolizmu oraz tworzą funkcjonalne połączenia z istniejącymi sieciami neuronalnymi,

gdyż odbierają i wysyłają sygnały w porównalnych pomiarach z komórkami biorcy. Stosując szereg analiz komórkowych i elektrofizjologicznych udowodniono, że możliwe jest funkcjonalne naprawienie uszkodzeń mózgu przy wykorzystaniu prekursorów neuralnych. Otwiera to możliwości zastosowania nowych podejść terapeutycznych, choć wymaga to jeszcze wielu badań do ostatecznego opracowania strategii klinicznej. Głównym wyzwaniem będzie znalezienie alternatywnych źródeł dla komórek pochodzenia zarodkowego. Szczególnie obiecujące kierunki wskazują badania nad bezpieczniejszymi niż obecnie technikami uzyskiwania indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych *in vitro* jako źródła komórek do przeszczepów oraz strategii przeprogramowywania stanu rozwojowego komórek *in vivo*. Oba zagadnienia wychodzą jednak poza ramy tematyczne niniejszej pracy, ale watro zapoznać się z literaturą na ten temat (OKANO i YAMANAKA 2014, LISZEWSKA i JAWORSKI 2013, KULCENTY i współaut. 2015).

Inny bardzo obiecujący kierunek badań w oparciu o naturalnie występujące prekursory neuralne stanowią glejowe komórki węchowe (ang. olfactory ensheathing cells, OECs, albo olfactory ensheathing glia, OEG). Są one specyficznym rodzajem gleju promienistego (gleju radialnego). Poza pełnieniem funkcji strukturalnych i pomocniczych, zachowały także własności progenitorowe (patrz YANG i współaut. 2015). Swoim ułożeniem mogą czasami przypominać swoiste osłonki wokół neuronów węchowych, trochę podobnie jak to robią komórki Schwanna w nerwach obwodowych. Glejowe komórki węchowe znajdują się zarówno w nabłonku węchowym wyściółki jamy nosowej i w nerwie węchowym (a więc po stronie obwodowego układu nerwowego), jak również w mózgu, w opuszkach węchowych. Wykazują zdolność fagocytowania, zwłaszcza w procesach ochrony wypustek neuronów czuciowych w nabłonku węchowym narażonych na bezpośrednie działanie czynników środowiskowych. Co jest szczególnie ważne, glejowe komórki węchowe w sposób ciągły uczestniczą w procesach regeneracyjnych neuronów czuciowych odbierających bodźce z zakończeń nerwowych w nabłonku węchowym, które ulegają dość częstej, cyklicznej wymianie co kilka tygodni.

Ponieważ glejowe komórki węchowe wykazują częściowo własności komórek obwodowego układu nerwowego, znacznie łatwiej poddającego się zjawiskom naprawczym/regeneracyjnym, a występują także w obrębie ośrodkowego układu nerwowego, właśnie z tymi komórkami wiąże się duże nadzieje w opracowywaniu nowych strategii napraw-

czych w uszkodzeniach mózgu oraz rdzenia kręgowego. Opisano, że glejowe komórki węchowe transplantowane u szczurów do pierwotnego ogniska uszkodzonego rdzenia kręgowego wpływały na regenerację długich aksonów uszkodzonych neuronów (RAMÓN-CUETO i współaut. 1998). Wykazano, że przeszczepione komórki uwalniały czynniki neurotroficzne takie jak: NGF, BDNF, płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. platelet-derived growth factor, PDGF), neurotrofina 3 (ang. neurotrophin-3, NT-3), aktywujące geny zaangażowane w procesy naprawcze (BUNGE 2008). Szereg doświadczeń na zwierzętach dowiodło, że przeszczepione glejowe komórki węchowe w modelach uszkodzenia rdzenia wpływały na mielinizację włókien i zwiększały regenerację aksonów (GORRIE i współaut. 2010, GLADWIN i CHOI 2015). Prawdziwy przełom w ostatnim czasie dostarczyły próby kliniczne przeprowadzone przez Pawła Tabakowa z grupy W. Jarmundowicza z Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu, a zwłaszcza dane uzyskane po długim czasie po przeszczepie (TABAKOW i współaut. 2014). Glejowe komórki węchowe, uzyskane z opuszki dzięki zastosowaniu nowej metody pobierania u pacjenta z częściowym przecięciem rdzenia kręgowego, zostały namnożone w warunkach *in vitro* i podane w licznych iniekcjach niedaleko miejsca uszkodzenia. Dzięki przeszczepowi i intensywnemu treningowi ruchowemu udało się u pacjenta przywrócić czucie, a następnie funkcje ruchowe w upośledzonych kończynach. Daje to duże nadzieje na rozwijanie podobnych technik wykorzystania autologicznych komórek w urazach i uszkodzeniach ośrodkowego układu nerwowego.

PERSPEKTYWY

Na zakończenie warto podkreślić, że nie do końca zbadane są jeszcze własne mechanizmy naprawcze ośrodkowego układu nerwowego. Zdolność funkcjonalnego kompensowania przez mózg czy rdzeń kręgowy skutków nawet poważnych uszkodzeń jest wciąż w niektórych przypadkach zaskakująca. Dobrym przykładem mogą być obserwacje, gdzie utrata nawet olbrzymiej liczby komórek w niektórych strukturach może nie dawać objawów klinicznych, np. często pierwsze symptomy choroby Parkinsona pojawiają się dopiero, gdy obumarło ponad 80% neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej (SPEAR 2000). Podobnie zaskakujące obserwacje odnotowuje się u licznych pacjentów po udarze mózgu, w wyniku którego pojawiają się duże upośledzenia mowy, zaburzenia ruchu, dysfunkcje wypowiedzania się (afazja), a po intensywnych ćwiczeniach

fizycznych i właściwie prowadzonej rehabilitacji ruchowej (oraz w dużej mierze dobrej motywacji pacjentów) możliwa jest znacząca poprawa utraconych funkcji, a nawet cofnięcie upośledzeń (PEDERSEN i współaut. 1995, SPEAR 2000). Z kolei, jako eksperymentalny przykład poprawienia funkcjonowania całego organizmu (zmiana działania centrum regulacji metabolizmu) po przeszczepieniu zaledwie niewielkiej liczby prekursorów neuralnych i niedojrzałych neuronów, ale w precyzyjnych mikrotransplantacjach do podwzgórza u otyłych myszy daje nadzieję, że celowane terapie komórkowe mogą być skuteczne (CZUPRYN i współaut. 2011). Konieczne jest szukanie innych źródeł komórek do przeszczepów niż materiał zarodkowy. Ponadto, zmienianie aktywności endogennych komórek, reprogramowanie *in vivo*, mogłoby stworzyć skuteczniejsze metody w oparciu o własne populacje komórkowe. Z wielu badań wynika jednak, że musi być zagwarantowana wysoka specyficzność podawanych/stosowanych komórek, a jednocześnie podejścia terapeutyczne nie mogą być stosowane na zbyt dużym obszarze, aby nie rozregulować dobrze funkcjonujących obwodów, bo nawet małe modyfikacje mogą powodować poważne skutki. Zatem wymagana jest bardzo duża precyzja stosowania poszczególnych terapii komórkowych. Koniecznych jest jednak wiele badań podstawowych i przedklinicznych (i to prowadzonych równolegle dla poszczególnych rodzajów uszkodzeń) zanim zaczniemy myśleć o większym sukcesie. Jednym z większych wyzwań będzie prawdopodobnie stosowanie unikalnych procedur naprawczych dla poszczególnych przypadków chorobowych.

STRESZCZENIE

Współczesna medycyna w miarę dobrze radzi sobie z leczeniem wielu chorób nabytych i wrodzonych, jednak skuteczna i trwała naprawa większości zaburzeń ośrodkowego układu nerwowego wciąż pozostaje poza naszymi możliwościami. Dlatego prowadzi się intensywne badania podstawowe i przedkliniczne, które umożliwiłyby lepsze poznanie przyczyn takich ograniczeń oraz dawały możliwość opracowania nowych terapii zaburzeń neurodegeneracyjnych, udarów, urazowego uszkodzenia mózgu i rdzenia kręgowego oraz innych chorób.

Jednym z bardziej obiecujących kierunków są terapie komórkowe z wykorzystaniem własnych, endogennych mechanizmów naprawczych, innym kierunkiem jest zastosowanie nowych, egzogennych komórek.

W pracy przedstawiono ogólne przyczyny trudności naprawy uszkodzeń mózgu, a następnie zjawiska powstawania nowych neuronów w mózgu dorosłych zwierząt i ludzi w sytuacji fizjologicznej oraz w sytuacji uszkodzenia mózgu. Omówiono niektóre przykłady wykorzystania prekursorów w strategiach naprawczych. W ostatniej części pracy przedstawiono wybrane terapie z zastosowaniem przeszczepów innych, mniej typowych prekursorów neuronów i gleju obecnych w mózgu w naprawie uszkodzeń ośrodkowego układu nerwowego.

LITERATURA

- ALVAREZ-BUYLLA A., GARCIA-VERDUGO J. M., 2002. *Neurogenesis in adult subventricular zone*. J. Neurosci. 22, 629-634.
- ALTMAN J., 1962. *Are new neurons formed in the brains of adult mammals?* Science 135, 1127-1128.
- ALTMAN J., 1963. *Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats*. Anat. Rec. 145, 573-591.
- ALTMAN J., DAS G. D., 1965. *Post-natal origin of microneurons in the rat brain*. Nature 207, 953-956.
- ARLOTTA P., MAGAVI S. S., MACKLIS J. D., 2003. *Induction of adult neurogenesis: molecular manipulation of neural precursors in situ*. Ann. NY Acad. Sci. 991, 229-236.
- ARRUDA-CARVALHO M., SAKAGUCHI M., AKERS K. G., JOSSELYN S. A., FRANKLAND P. W., 2011. *Posttraining ablation of adult-generated neurons degrades previously acquired memories*. J. Neurosci. 31, 15113-15127.
- ARVIDSSON A., COLLIN T., KIRIK D., KOKAIA Z., LINDVALL O., 2002. *Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke*. Nat. Med. 8, 963-970.
- AZEVEDO F. A., CARVALHO L. R., GRINBERG L. T., FARFEL J. M., FERRETTI R. E., LEITE R. E., JACOB FILHO W., LENT R., HERCULANO-HOUZEL S., 2009. *Equal numbers of neuronal and non-neuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain*. J. Comp. Neurol. 513, 532-541.
- BAILEY C. H., KANDEL E. R., HARRIS K. M., 2015. *Structural components of synaptic plasticity and memory consolidation*. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 7, doi: 10.1101/cshperspect.a021758.
- BRAUN S. M. G., PILZ G. A., MACHADO R. A. C., MOSS J., BECHER B., TONI N., JESSBERGER S., 2015. *Programming hippocampal neural stem/progenitor cells into oligodendrocytes enhances remyelination in the adult brain after injury*. Cell Rep. 11, 1679-1685.
- BUNGE M. B., 2008. *Novel combination strategies to repair the injured mammalian spinal cord*. J. Spinal Cord Med. 31, 262-269.
- CHEN G., WERNIG M., BERNINGER B., NAKAFUKU M., PARMAR M., ZHANG C. L., 2015. *In vivo reprogramming for brain and spinal cord repair*. eNeuro 2, doi: ENEURO.0106-15.2015.
- CHO K. O., LYBRAND Z. R., ITO N., BRULET R., TAFACORY F., ZHANG L., GOOD L., URE K., KERNIE S. G., BIRNBAUM S. G., SCHARFMAN H. E., EISCH A. J., HSIEH J., 2015. *Aberrant hippocampal neurogenesis contributes to epilepsy and associated cognitive decline*. Nat. Commun. 6, 6606.
- CLOWRY G., MOLNÁR Z., RAKIC P., 2010. *Renewed focus on the developing human neocortex*. J. Anat. 217, 276-288.
- CZUPRYN A., ZHOU Y. D., CHEN X., MCNAY D., ANDERSON M. P., FLIER J. S., MACKLIS J. D., 2011. *Transplanted hypothalamic neurons restore leptin signaling and ameliorate obesity in db/db mice*. Science 334, 1133-1137.
- DE FILIPPIS L., BINDA E., 2012. *Concise review: self-renewal in the central nervous system: neural stem cells from embryo to adult*. Stem Cells Transl. Med. 1, 298-308.
- DOETSCH F., CAILLÉ I., LIM D. A., GARCÍA-VERDUGO J. M., ALVAREZ-BUYLLA A., 1999. *Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain*. Cell 97, 703-716.

- GAGE F. H., 2000. *Mammalian neural stem cells*. Science 287, 1433-1438.
- GLADWIN K., CHOI D., 2015. Olfactory ensheathing cells: part I – current concepts and experimental laboratory models. World Neurosurg. 83, 114-119.
- GORRIE C. A., HAYWARD I., CAMERON N., KAILAINATHAN G., NANDAPALAN N., SUTHARSAN R., WANG J., MACKAY-SIM A., WAITE P. M., 2010. Effects of human OEC-derived cell transplants in rodent spinal cord contusion injury. Brain Res. 1337, 8-20.
- GOULD E., 2007. How widespread is adult neurogenesis in mammals? Nat. Rev. Neurosci. 8, 481-488.
- HERCULANO-HOUZEL S., MANGER P. R., KAAS J. H., 2015. Brain scaling in mammalian evolution as a consequence of concerted and mosaic changes in numbers of neurons and average neuronal cell size. Front. Neuroanat. 8, doi: 10.3389/fnana.2014.00077. Erratum in: Front. Neuroanat. 2015, 9, 38.
- HUANG Y., TAN S., 2015. Direct lineage conversion of astrocytes to induced neural stem cells or neurons. Neurosci. Bull. 3, 1357-1367.
- JABLONSKA B., AGUIRRE A., RAYMOND M., SZABO G., KITABATAKE Y., SAILOR K. A., MING G. L., SONG H., GALLO V., 2010. Chordin-induced lineage plasticity of adult SVZ neuroblasts after demyelination. Nat. Neurosci. 13, 541-550.
- JAHOŁKOWSKI P., KIRYK A., JEDYNAK P., BEN ABDALLAH N. M., KNAPSKA E., KOWALCZYK A., PIECHAL A., BLECHARZ-KLIN K., FIGIEL I., LIODYNO V., WIDY-TYSZKIEWICZ E., WILCZYNSKI G. M., LIPP H. P., KACZMAREK L., FILIPKOWSKI R. K., 2009. New hippocampal neurons are not obligatory for memory formation; cyclin D2 knockout mice with no adult brain neurogenesis show learning. Learn. Mem. 16, 439-451.
- KEMPERMANN G., JESSBERGER S., STEINER B., KRONENBERG G., 2004. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. Trends Neurosci. 27, 447-452.
- KOKOEVA M. V., YIN H., FLIER J. S., 2005. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. Science 310, 679-683.
- KRIEGSTEIN A., ALVAREZ-BUYLLA A., 2009. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. Annu. Rev. Neurosci. 32, 149-184.
- KULCENTY K., WRÓBLEWSKA J., MAZUREK S., LISZEWSKA E., JAWORSKI J., 2015. Molecular mechanisms of induced pluripotency. Współczesna Onkologia (Pozn.) 19, A22-A29.
- LIM D. A., ALVAREZ-BUYLLA A., 2014. Adult neural stem cells stake their ground. Trends Neurosci. 37, 563-571.
- LISZEWSKA E., JAWORSKI J., 2013. Po co neurobiologom indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste? Post. Biochem. 59, 164-174.
- LLEDO P. M., MERKLE F. T., ALVAREZ-BUYLLA A., 2008. Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. Trends Neurosci. 31, 392-400.
- MADHAVAN L., COLLIER T. J., 2010. A synergistic approach for neural repair: cell transplantation and induction of endogenous precursor cell activity. Neuropharmacology 58, 835-844.
- MAGAVI S. S., LOIS C., 2008. Transplanted neurons form both normal and ectopic projections in the adult brain. Develop. Neurobiol. 68, 1527-1537.
- MAGAVI S. S., LEAVITT B. R., MACKLIS J. D., 2000. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. Nature 405, 951-955.
- MING G. L., SONG H., 2011. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. Neuron 70, 687-702.
- MO Z., ZECEVIC N., 2009. Human fetal radial glia cells generate oligodendrocytes in vitro. Glia 57, 490-498.
- OKANO H., YAMANAKA S., 2014. iPS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease. Mol. Brain 7, 22.
- PEDERSEN P. M., JØRGENSEN H. S., NAKAYAMA H., RAASCHOU H. O., OLSEN T. S., 1995. Aphasia in acute stroke: incidence, determinants, and recovery. Ann. Neurol. 38, 659-666.
- PINTO L., GÖTZ M., 2007. Radial glial cell heterogeneity – The source of diverse progeny in the CNS. Prog. Neurobiol. 83, 2-23.
- QIN Y., ZHANG W., YANG P., 2015. Current states of endogenous stem cells in adult spinal cord. J. Neurosci. Res. 93, 391-398.
- RAMÓN-CUETO A., PLANT G. W., AVILA J., BUNGE M. B., 1998. Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. J. Neurosci. 18, 3803-3815.
- RAMÓN Y CAJAL S., 1913. *Degeneration and regeneration of the nervous system*. Hafner, New York.
- ROTHENEICHNER P., MARSCHALLINGER J., COUILLARD-DESPRES S., AIGNER L., 2013. Neurogenesis and neuronal regeneration in status epilepticus. Epilepsia 54, 40-42.
- SCHARFMAN H. E., HEN R., 2007. Neuroscience. Is more neurogenesis always better? Science 315, 336-338.
- SEABERG R. M., VAN DER KOY D., 2003. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. Trends Neurosci. 26, 125-131.
- SERI B., GARCÍA-VERDUGO J. M., MCEWEN B. S., ALVAREZ-BUYLLA A., 2001. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. J. Neurosci. 21, 7153-7160.
- SNAPYAN M., LEMASSON M., BRILL M. S., BLAIS M., MASSOUH M., NINKOVIC J., GRAVEL C., BERTHOD F., GÖTZ M., BARKER P. A., PARENT A., SAGHATELYAN A., 2009. Vasculature guides migrating neuronal precursors in the adult mammalian forebrain via brain-derived neurotrophic factor signaling. J. Neurosci. 29, 4172-4188.
- SPEAR L. P., 2000. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. Neurosci. Biobehav. Rev. 24, 417-463.
- TABAKOW P., RAISMAN G., FORTUNA W., CZYZ M., HUBER J., LI D., SZEWCZYK P., OKUROWSKI S., MIEDZYSBRODZKI R., CZAPIGA B., SALOMON B., HALON A., LI Y., LIPIEC J., KULCZYK A., JARMUNDOWICZ W., 2014. Functional regeneration of supraspinal connections in a patient with transected spinal cord following transplantation of bulbar olfactory ensheathing cells with peripheral nerve bridging. Cell Transplant. 23, 1631-1655.
- THOMPSON L. H., BJÖRKLUND A., 2015. Reconstruction of brain circuitry by neural transplants generated from pluripotent stem cells. Neurobiol. Dis. 79, 28-40.
- YANG H., HE B. R., HAO D. J., 2015. Biological roles of olfactory ensheathing cells in facilitating neural regeneration: a systematic review. Mol. Neurobiol. 51, 168-179.
- YONEYAMA M., SHIBA T., HASEBE S., OGITA K., 2011. Adult neurogenesis is regulated by endogenous factors produced during neurodegeneration. J. Pharmacol. Sci. 115, 425-432.

KOSMOS Vol. 65, 2, 163–175, 2016

CELLULAR THERAPIES AND NEURAL PRECURSORS IN THE ADULT BRAIN

ARTUR CZUPRYN

Department of Molecular and Cellular Neurobiology, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, 3 Pasteur St., 02-093 Warsaw, E-mail: artur@nencki.gov.pl

Summary

Modern medicine can treat relatively well many acquired and congenital diseases but still an effective and durable repair of the most of central nervous system disorders is beyond our capabilities. Therefore, comprehensive basic and preclinical studies are being carried out which would allow a better understanding of the reasons of these limits. They can potentially provide new strategies for neurodegenerative disorders, stroke, traumatic brain and spinal cord injury, and other diseases.

Some of the most promising approaches are cell therapies with the use of endogenous repair mechanisms, but also another direction might be provided with new exogenous cell therapies.

The article outlines the general reasons for the difficulties in the brain repair and discusses the phenomenon of new neurons in the brain of adult animals and humans, in the context of physiology and the brain injury. Promising strategies with neural precursors in the Central Nervous System repair are presented. Finally, promising state-of-the-art approaches with not typical cell subtypes of neuronal and glial precursors from the brain transplantation therapies are presented.